

高效液相色谱法定量黄酒中的5-羟甲基糠醛

陈娟 张雯 倪莉

(福州大学食品科学技术研究所,福建 福州 350002)

摘要: 运用高效液相色谱法测定黄酒中的5-羟甲基糠醛(5-HMF)的含量,以5%甲醇水溶液为流动相,采用C₁₈色谱柱,在UV284 nm波长条件下检测样品中的5-HMF。结果表明,该方法快速、准确,在0.345~34.50 μg/mL范围内线性相关系数为 $r^2=0.9996$,平均回收率87.44%~90.22%,相对标准偏差为0.33%~1.24%。

关键词: 黄酒; 高效液相色谱; 5-羟甲基糠醛; 分析方法

中图分类号:TS262.4;TS261.7;O657.72

文献标识码:B

文章编号:1001-9286(2009)03-0106-03

Determination of 5-Hydroxymethylfurfural in Yellow Rice Wine by HPLC

CHEN Juan, ZHANG Wen and NI Li

(Research Institute of Food Science and Technology, Fuzhou University, Fuzhou, Fujian 350002, China)

Abstract: The content of 5-hydroxymethylfurfural in yellow rice wine was measured by HPLC. The related technical conditions were as follows: C₁₈ chromatographic column used and samples detected at 284 nm by using a mixture of methanol and water (5:95, v/v) as the mobile phase. Within the linear range of 0.345~34.50 μg/mL ($r^2=0.9996$), the method was fast and accurate with the average recovery rate and relative standard deviation as 87.44%~90.22% and 0.33%~1.24% respectively.

Key words: yellow rice wine; HPLC; 5-hydroxymethylfurfural; analytic method

黄酒是以稻米、黍米、玉米、小米、小麦等为主要原料,经蒸煮、加曲、糖化、发酵、压榨、过滤、煎酒、贮存、勾兑而成的酿造酒^[1]。5-羟甲基糠醛是葡萄糖或果糖等单糖化合物在高温或酸性环境催化等条件下脱水产生的一种醛类化合物,广泛存在于焦糖、酒类、酱油、咖啡、葡萄干、乳制品、蜂蜜以及某些天然产物中。因此,在黄酒体系中可能也存在该物质。

目前,对5-羟甲基糠醛的研究表明:一方面,通过一系列的细胞和动物实验发现,5-HMF可以从抗氧化、提高神经细胞在病理损伤的存活率、稳定细胞膜、调节钙离子平衡等多方面改善亨廷顿病大鼠模型的记忆能力和运动能力,对老年痴呆病有良好的改善作用^[2];并且,5-HMF及其衍生物可以改善神经缺血缺氧以及神经损伤导致的功能障碍,减轻神经细胞水肿,提高自由基清除能力,减少自由基损伤以及减轻神经细胞钙超载等药效^[3]。从中药古方生脉散合煎剂中发现、分离并鉴定出的5-HMF的药效试验表明了5-HMF具有抗氧化作用,能降低心肌缺血小鼠血清中乳酸脱氢酶(LDH)活性,降低心肌缺血小鼠心肌组织中丙二醛(MDA)含量,具有抗心肌缺血作用^[4]。通过对脑缺血再灌注小鼠的动物实验表明,

5-HMF口服给药可改善脑缺血再灌注引起的学习记忆障碍^[5]。另一方面,研究者认为5-HMF可引起动物横纹肌麻痹和内脏损害,因而,《中国药典》(2000版)对葡萄糖和葡萄糖氯化钠注射液中5-HMF的含量均做了限量规定^[6]。

目前,5-羟甲基糠醛含量的测定方法主要有:高效液相色谱法^[7~8]、液相色谱质谱法^[9]和气相色谱质谱法^[10]。这些方法主要适用于蜂蜜、燕麦、果汁、果酱等食品中羟甲基糠醛的测定。目前,对于黄酒中5-羟甲基糠醛含量的检测尚未见报道。因而建立一种快速、方便、经济的检测方法,有利于保障人们的消费安全和进一步研究黄酒与5-羟甲基糠醛的功能性和安全性。本文采用高效液相色谱法对5-羟甲基糠醛进行定量测定,建立一种快速分析黄酒中5-羟甲基糠醛的方法。

1 材料与方法

1.1 仪器与材料

1.1.1 仪器

Agilent 1100 series 高效液相色谱仪, VWD 检测器; SUPELCO 25 cm×4.6 mm, 5 μm, C₁₈ 色谱柱。

基金项目:福建省自然科学基金计划资助项目(项目编号 2008J0294),福建省高等学校新世纪优秀人才支持计划(项目编号 SW2006-16)。

收稿日期:2008-12-18

作者简介:陈娟(1982-),女,硕士。

通讯作者:倪莉,女,副教授, E-mail: nili@fzu.edu.cn。

1.1.2 药品

5-HMF 标准品购买于 Aifa aesar 公司, 甲醇为色谱纯; 水为超纯水。

1.1.3 标准品溶液的配制

精确称取 0.0345 g 5-HMF 标准品, 用 5% 甲醇水溶液溶解后定容至 100 mL, 得 0.345 mg/mL 的 5-HMF 标准品贮备液, 并用水稀释成不同浓度的标准品工作液。

1.1.4 样品溶液的配制

准确各种样品, 用 5% 甲醇水溶液稀释至相应浓度, 用 0.45 μm 滤膜过滤后进样。

1.2 实验方法

色谱条件为流动相: 甲醇: 水 = 5: 95 (v/v); 柱温: 30 $^{\circ}\text{C}$; 流速为 1.0 mL/min。

检测波长: 284 nm; 进样体积: 20 μL 。

2 结果与分析

2.1 HPLC的分析效果

前期实验考察了甲醇水溶液流动相体系的浓度对 HMF 分离效果的影响, 通过比较选用 5% 甲醇水溶液作为流动相的色谱峰形较好, 改善了色谱峰形, 减少了拖尾现象。通过实验优化, 得到所述色谱条件。在该条件下, 5-HMF 的标准品和样品均在 15 min 内出峰且能与其他组分较好地分离 (见图 1、图 2)。

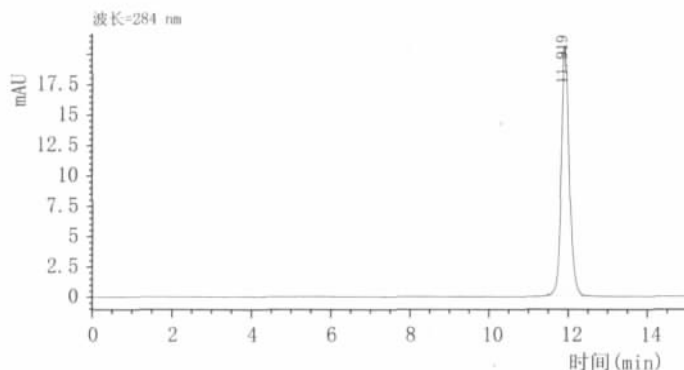


图1 5-羟甲基糠醛(5-HMF)标样测定图谱

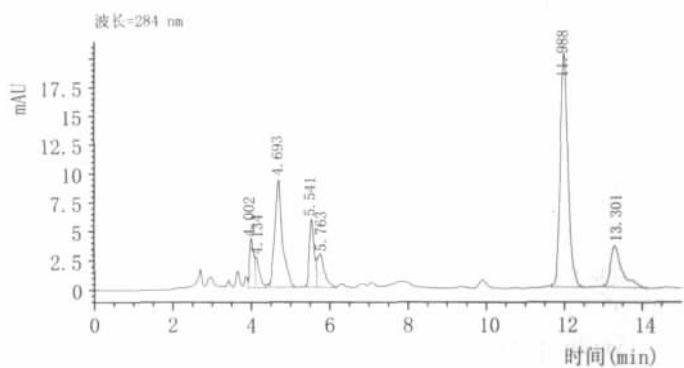


图2 样品测定图谱

2.2 标准工作曲线

取 5-HMF 标准品贮备液, 用 5% 甲醇水溶液稀释成质量浓度分别为 34.5 $\mu\text{g/mL}$ 、23 $\mu\text{g/mL}$ 、17.25 $\mu\text{g/mL}$ 、13.8 $\mu\text{g/mL}$ 、6.90 $\mu\text{g/mL}$ 、3.45 $\mu\text{g/mL}$ 、1.7 $\mu\text{g/mL}$ 、0.575 $\mu\text{g/mL}$ 和 0.345 $\mu\text{g/mL}$ 的标准品工作液, 在上述色谱条件下进样, 以 5-HMF 的峰高与其质量浓度进行线性回归, 得到回归方程 $Y = 11.02X + 1.8991$, $r^2 = 0.9996$, 结果见图 3。

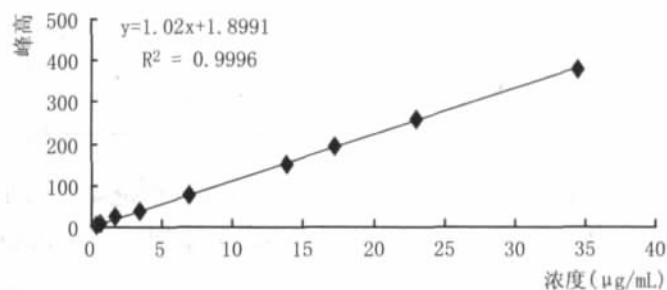


图3 5-羟甲基糠醛检测标准曲线

由实验结果表明, 当 5-HMF 的质量浓度不大于 34.5 $\mu\text{g/mL}$ 时, 其质量浓度与峰面积之间存在良好的线性关系。

2.3 重复性实验

取同一黄酒样品, 相同体积进样 6 次, 分别按上述色谱条件测定其中 5-HMF 的含量, 计算所测含量的相对标准偏差 (RSD) 为 0.01% (见表 1), 说明本方法用于测定黄酒中 5-HMF 含量具有较好的重复性。

表1 重复性实验结果

序号	5-HMF 浓度 ($\mu\text{g/mL}$)	平均值 ($\mu\text{g/mL}$)	标准 偏差	RSD (%)
1	2.024	2.015	0.01	0.01
2	2.024			
3	2.006			
4	2.006			
5	1.996			
6	2.033			

2.4 稳定性实验

取上述制备的标准品溶液, 室温放置, 每 1.5 h 进样 1 次, 测定 6 次, 分别进样 20 μL 。结果表明, 所测含量的相对标准偏差 (RSD) 为 0.02% (见表 2), 说明处理后的标准溶液在室温条件下 7.5 h 内稳定。

表2 稳定性实验结果

时间 (h)	5-HMF 浓度 ($\mu\text{g/mL}$)	平均值 ($\mu\text{g/mL}$)	标准 偏差	RSD (%)
0	2.015	2.018	0.02	0.02
1.5	2.033			
3	2.033			
4.5	2.042			
6	2.006			
7.5	1.978			

2.5 精密度实验

在室温条件下,取同一质量浓度的 5-HMF 标准品溶液连续 6 次进样,每次 20 μL 。结果见表 3。

表3 精密度实验结果

序号	5-HMF 浓度 ($\mu\text{g/mL}$)	平均值 ($\mu\text{g/mL}$)	标准 偏差	RSD (%)
1	3.394	3.408	0.01	0.02
2	3.394			
3	3.394			
4	3.412			
5	3.421			
6	3.430			

表 3 结果表明,同样浓度的标准品连续进样的标准偏差为 0.01,相对标准偏差为 0.02%,说明该方法的精密度较高。

2.6 加样回收实验

取同一黄酒样品,分为 3 组,分别加入一定量一定浓度的 5-HMF 标准品贮备液,按上述色谱条件测定其中 5-HMF 的含量,计算本方法的回收率(见表 4)。表 4 结果显示,3 个水平的平均回收率分别为 90.22%、87.44% 和 88.59%。

表4 5-羟甲基糠醛添加回收率和相对标准偏差

项目	添加量($\mu\text{g/mL}$)		
	1.2	1.92	2.875
回收率 (%)	1	88.20	87.91
	2	89.72	87.91
	3	89.72	87.91
	4	91.23	87.91
	5	91.23	86.97
	6	91.23	86.02
平均回收率(%)	90.22	87.44	88.59
RSD(%)	1.24	0.79	0.33

2.7 样品测定

量取市售代表性黄酒产品,按既定实验条件制备样品溶液,用高效液相色谱测定其中的 5-HMF 的含量(见表 5)。

表5 黄酒中5-羟甲基糠醛的含量的分析结果

酒样	浓度 (mg/mL)	酒样	浓度 (mg/mL)
干型福建黄酒	0.017	半甜型福建黄酒	0.001
半干型福建黄酒	0.007	半干型绍兴黄酒	0.027

检测结果(表 5)表明,所选择的各品种黄酒均含有一定的 5-HMF,不同酒的含量差别较大,这可能与工艺和贮存时间的不同有关。

3 结论

3.1 建立了高效液相色谱定量检测黄酒中 5-羟甲基糠

醛含量方法。其前处理简单、易操作,准确度、精密度均较高,重现性良好。运用该方法检测不同品种的黄酒中的 5-羟甲基糠醛含量,平均回收率为 87.44%~90.22%,相对标准偏差为 0.33%~1.24%。在所选择的具有代表性的黄酒中均检测到 5-羟甲基糠醛的存在,但是不同品种的黄酒的 5-羟甲基糠醛的含量差别较大,可能与工艺和贮存时间的不同有关。

3.2 由目前已对 5-羟甲基糠醛进行的功能性和安全性的研究^[3~7],可以判断黄酒体系中存在的 5-HMF 既对黄酒的抗氧化活性有贡献作用,也有可能对黄酒的安全性存在潜在风险。

3.3 目前尚未有关于对黄酒中的 5-羟甲基糠醛的作用的研究,并且国家尚未制订黄酒中 5-羟甲基糠醛含量的检测方法,因而本方法的建立不仅可以为黄酒质量的监控和标准方法的建立提供一个有力的参考,也为黄酒和 5-羟甲基糠醛的研究提供一个新思路。

参考文献:

- [1] GB/T13662-2000,中华人民共和国国家标准——黄酒[S].
- [2] 李林,张兰,楚晋,张如意.5-羟甲基糠醛在制备防治神经退行性疾病和认知损害的药品和保健品中的用途[P].中国专利:CN02153732.1,2004-06-16.
- [3] 李林,魏海峰,张兰,等.5-羟甲基糠醛类用于制备神经系统用药的用途[P].中国专利:CN03146245.6,2005-01-19.
- [4] 严永清,朱丹妮,陈婷,等.5-羟甲基-2-糠醛的医药用途[P].中国专利:CN97107191.8,1998-05-27.
- [5] 赵玲,张兰,李雅莉,等.5-羟甲基糠醛对脑缺血再灌注模型小鼠学习记忆及脑部自由基的影响[J].中国药房,2007,(18):974-976.
- [6] 伦新强,莫益三.含糖平衡注射液 5-羟甲基糠醛的限量检查[J].中国药业,2004,(13):43.
- [7] Vural Gökmen, Jale Acar. Simultaneous determination of 5-hydroxymethylfurfural and patulin in apple juice by reversed-phase liquid chromatography[J].Journal of Chromatography A, 1999, (847):69-74.
- [8] Emilia Ferrer, Amparo Alegría, Rosaura Farré. High-performance liquid chromatographic determination of furfural compounds in infant formulas during full shelf-life[J].Food Chemistry, 2005, (89):639-645.
- [9] Erika Teixidó, Encarnación Moyano, F. Javier Santos. Liquid chromatography multi-stage mass spectrometry for the analysis of 5-hydroxymethylfurfural in foods[J].Journal of Chromatography A, 2008, (1185):102-108.
- [10] E. Teixidó, F.J. Santos, L. Puignou. Analysis of 5-hydroxymethylfurfural in foods by gas chromatography-mass spectrometry[J].Journal of Chromatography A, 2006, (1135):85-90.