DOI:10.12441/spyswjs.20240922001　　[文章编号] 1673-1689(2025)10-0064-10

高效液相色谱法同时测定发芽黑小麦中11种酚酸化合物

李　倩[1,2,3]　李小东[2,4]　杨子怡[1,2,3]　张悦瑶[1,2,3]　刘　瑞[1,2,3*]　于章龙[2,4]　孙元琳[1,3]

(1. 运城学院生命科学系,山西 运城 044099; 2. 山西农业大学食品科学与工程学院,山西 太谷 030801; 3. 山西省特优农产品梯次高值利用技术创新中心,山西 运城 044099; 4. 山西农业大学棉花研究所,山西 运城 044099)

摘要:【目的】为研究发芽对黑小麦中酚酸化合物质量分数的影响,建立了使用高效液相色谱法(HPLC)同时测定发芽黑小麦中11种酚酸化合物(没食子酸、原儿茶酸、对羟基苯甲酸、绿原酸、香草酸、咖啡酸、丁香酸、对香豆酸、阿魏酸、芥子酸和水杨酸)质量分数的方法。**【方法】**以甲醇(含体积分数1%乙酸)-水(含体积分数1%乙酸)为流动相,进行梯度洗脱,流量1 mL/min,检测波长280 nm,柱温25 ℃,对发芽第1、3、5、7天的黑小麦中11种酚酸化合物进行测定。**【结果】**方法学验证结果显示,在质量浓度为20~200 μg/mL时,11种酚酸化合物质量浓度与峰面积线性关系良好,相关系数(R^2)≥0.999 4(n=6),检出限(limit of detection,LOD)≥1.22 μg/mL,定量限(limit of quantification,LOQ)≥2.54 μg/mL,精密度、重复性和稳定性试验中11种酚酸化合物色谱峰的峰面积相对标准偏差(relative standard deviation,RSD)均小于2.00%,平均加标回收率为98.02%~101.12%,表明所建立的测定方法快捷,且结果准确可靠。在提取条件优化中发现,当料液比为1 g∶30 mL时,以体积分数为80%的甲醇溶液涡旋提取6 min,所测发芽黑小麦中11种酚酸化合物总质量分数较高。发芽黑小麦中可以检测出没食子酸,且在发芽第3天质量分数达到峰值;11种酚酸化合物总质量分数在发芽第5天最高,是未发芽黑小麦对照组的2.13倍,这表明发芽处理能改变黑小麦中酚酸化合物的质量分数。**【结论】**该研究评价了不同提取条件对发芽黑小麦中11种酚酸化合物的影响,并对其质量分数进行测定,可为发芽黑小麦中功能活性成分的研究奠定基础,也为其产品的质量控制和评估提供参考。

关键词:发芽;黑小麦;酚酸化合物;高效液相色谱法

Establishment of a HPLC Method for Simultaneous Determination of 11 Phenolic Acids in Germinated Black Wheat

LI Qian[1,2,3]　*LI Xiaodong*[2,4]　*YANG Ziyi*[1,2,3]　*ZHANG Yueyao*[1,2,3]
LIU Rui[1,2,3*]　*YU Zhanglong*[2,4]　*SUN Yuanlin*[1,3]

(1. Life Sciences Department, Yuncheng University, Yuncheng 044099, China; 2. College of Food Science and Engineering, Shanxi Agricultural University, Taigu 030801, China; 3. Shanxi Technology Innovation Center of High Value-Added Echelon Utilization of Premium Agro-Products, Yuncheng 044099, China; 4. Institute of Cotton Research, Shanxi Agricultural University, Yuncheng 044099, China)

Abstract: [**Objective**] In order to study the effects of germination on the mass fractions of phenolic acids in black wheat, a method was established for simultaneous determination of 11 phenolic acids (gallic acid, protocatechuic acid, 4-hydroxybenzoic acid, chlorogenic acid, vanillic acid, caffeic acid, syringic acid,

基金项目:国家自然科学基金面上项目(32072222);山西省基础研究计划项目(20210302124069);山西省现代农业产业技术体系建设专项项目(2024CYJSTX10-22);山西省研究生教育教学改革课题项目(2022YJJG269);运城市基础研究计划项目(YCKJ-2024024);运城学院食品科学与工程校级重点学科经费资助项目(XK-2021008);特色农产品发展学科群科研项目(SKX-202211)。

通信作者:刘瑞(1987—),女,博士,副教授,硕士研究生导师,主要从事功能食品与品质调控研究。E-mail:liuruiycu@126.com

收稿日期:2024-09-22　**修回日期:**2025-01-06

p-coumaric acid, ferulic acid, sinapic acid, and salicylic acid) in germinated black wheat based on high performance liquid chromatography (HPLC). [**Method**] The mobile phase composed of methanol (containing acetic acid at a volume fraction of 1%) and water (containing acetic acid at a volume fraction of 1%) was used for gradient elution at a flow rate of 1 mL/min, a detection wavelength of 280 nm, and a column temperature of 25 ℃, to determine the mass fractions of 11 phenolic acids in black wheat on the 1st, 3rd, 5th and 7th days of germination. [**Result**] The results of methodology validation showed that 11 phenolic acids had a good linear relationship between mass concentration and peak area within the mass concentration range from 20 to 200 μg/mL, R^2≥0.999 4 (n=6). The established method showed the limit of detection (LOD) ≥1.22 μg/mL and the limit of quantification (LOQ) ≥2.54 μg/mL for the phenolic acids. The relative standard deviations (RSD) of peak area of precision, repeatability, and stability were all less than 2.00%, and the average spiked recovery rates were between 98.02% and 101.12%, indicating that the established method was fast, accurate, and reliable. The extraction conditions were optimized as extraction with the solid-liquid ratio of 1 g∶30 mL and methanol at a volume fraction of 80% by vortex for 6 min, under which the total mass fraction of 11 phenolic acids in germinated black wheat was the highest. The results showed that during germination, the mass fraction of gallic acid in black wheat reached the peak on the 3rd day of germination. The total mass fraction of 11 phenolic acids was the highest on the 5th day of germination, which was 2.13 times of that in the non-germinated control group. This indicated that germination changed the mass fractions of phenolic acids in black wheat. [**Conclusion**] This study evaluated the effects of extraction conditions on 11 phenolic acids and determined the mass fractions of the 11 phenolic acids in germinated black wheat. The findings lay a foundation for the study of functional components in germinated black wheat and provide a reference for the quality control and evaluation of its products.

Keywords: germination; black wheat; phenolic acid; high performance liquid chromatography

黑小麦中的活性成分种类繁多，含量丰富，主要有酚酸化合物、黄酮类化合物、花色苷等[1]。这些活性成分是黑小麦中天然的抗氧化剂，能有效清除体内自由基、提高人体免疫力、调节血脂、预防癌症等[2]。植物多酚是黑小麦中种类最多、含量最高的一类植物化学物质[3]。Singh等[4]研究表明，小麦发芽后其酚类化合物含量、抗氧化活性、还原力均显著提高。谷物发芽过程中多种酶活力激增[5-6]，抗营养因子的含量降低[7]，蛋白质和淀粉的消化率提高[8]，功能活性成分富集[9]。酚类化合物是指苯环上的氢原子被羟基或其他基团取代后生成的一系列化合物，是植物为抵御外部伤害而产生的一类重要次生代谢物[10]，具有抗氧化[11-12]、抗癌[13]、抗炎[14]、保护神经[15]、抗糖尿病[16]等生物活性。酚酸属于酚类化合物，可分为羟基肉桂酸和羟基苯甲酸衍生物两类，也是谷物中最主要的酚类化合物[17]。羟基苯甲酸衍生物主要以葡萄糖苷的形式存在于谷物中，如没食子酸、原儿茶酸、对羟基苯甲酸、丁香酸等[18]；常见的羟基肉桂酸是一类苯丙素类芳香酸，可看作是肉桂酸的衍生物，主要有对香豆酸、咖啡酸、芥子酸、阿魏酸等[19]。

目前对酚酸化合物进行定量分析的方法有分光光度法、HPLC、薄层色谱法、超高效液相色谱-质谱联用法（UPLC-MS/MS）[20]、核磁共振法[21]等。但分光光度法测定的是总酚含量，薄层色谱法对生物高分子的分离能力有限。酚酸化合物的检测方法主要为液相色谱-质谱联用法（LC-MS）[22]或UPLC-MS/MS，但由于仪器价格昂贵，且对设备操作要求较高，因此目前HPLC仍是定量分析酚酸化合物最有效而简便易行的方法。例如，曹众富[23]采用HPLC测定了全谷物米粉中4种酚酸化合物；黄永健等[24]采用HPLC测定了竹笋中8种酚酸化合物，但以上研究中测得的酚酸化合物种类相对有限。

作者以黑小麦为原料，拟通过优化色谱分析方法及提取条件，建立使用HPLC对黑小麦发芽过程中11种酚酸化合物（没食子酸、原儿茶酸、对羟基苯甲酸、绿原酸、香草酸、咖啡酸、丁香酸、对香豆酸、阿魏酸、芥子酸和水杨酸）的测定方法，旨在为黑小麦功能活性成分的研究及其产品质量的控制和评估提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

黑小麦：‘运黑 161’，山西农业大学棉花研究所；酚酸化合物标准品（没食子酸、原儿茶酸、对羟基苯甲酸、绿原酸、香草酸、咖啡酸、丁香酸、对香豆酸、阿魏酸、芥子酸、水杨酸）：纯度≥97%，美国 Sigma-Aldrich 公司；冰乙酸：色谱级，天津市瑞金特化学品有限公司；甲醇：色谱级，西陇科学股份有限公司；试验用水为超纯水。

1.2 仪器与设备

高效液相色谱仪（配有 Prominence SPD-20A UV-VIS 检测器）：LC-20AT 型，日本岛津公司；Sigma-C18 色谱柱（4.6 mm×250 mm×5 μm）：美国 Sigma-Aldrich 公司；恒温恒湿培养箱：HWS-160 型，宁波江南仪器厂；高速冷冻离心机：GL-20B 型，上海安亭科学仪器有限公司；真空冷冻干燥机：SCIENTZ-10N 型，宁波新芝科技有限公司；紫外-可见光分光光度计：UV9000S 型，上海元析仪器有限公司；旋转蒸发器：RE-52A 型，上海亚荣生化仪器厂。

1.3 方法

1.3.1 色谱分析方法的建立

1）检测波长确定：分别精确称取 11 种酚酸化合物标准品 50 mg，用甲醇溶解后定容至 50 mL，制得质量浓度为 1.00 mg/mL 的标准品溶液。采用紫外-可见光分光光度计对各标准品溶液进行全波长扫描，以甲醇为空白溶剂，根据扫描结果确定最终检测波长。

2）流动相确定：分别吸取 11 种酚酸化合物标准品溶液（1.00 mg/mL）2.00 mL 于 1 个 50 mL 容量瓶中，用甲醇定容，配制成 11 种酚酸化合物质量浓度均为 40 μg/mL 的混合标准品溶液，比较流动相分别为甲醇-水（含体积分数 0.1% 乙酸）、乙腈-水（含体积分数 0.1% 乙酸）、甲醇-水（含体积分数 0.1% 磷酸）和乙腈-水（含体积分数 0.1% 磷酸）时，各酚酸化合物的出峰情况以及分离效果，在此基础上调整流动相配比，确定梯度洗脱程序。

1.3.2 色谱条件

Sigma-C18 色谱柱，流动相 A 为甲醇（含体积分数 1% 乙酸），流动相 B 为水（含体积分数 1% 乙酸），进样体积 10 μL，流量 1 mL/min，检测波长 280 nm，柱温 25 ℃。梯度洗脱程序：0~10 min，流动相 A 体积分数由 8% 升至 10%；10~23 min，流动相 A 体积分数由 10% 升至 30%；23~38 min，流动相 A 体积分数由 30% 升至 33%；38~45 min，流动相 A 体积分数由 33% 升至 50%。

1.3.3 标准曲线的线性范围和 LOD、LOQ 测定

准确称取 11 种酚酸化合物标准品各 50 mg，用甲醇溶解后定容至 50 mL，制得各酚酸化合物质量浓度均为 1.00 mg/mL 的混合标准品母液，再分别吸取 5.0、10.0、12.5、25.0、50.0 mL 的混合标准品母液于 5 个 250 mL 的容量瓶中，用甲醇定容，制得 11 种酚酸化合物质量浓度分别为 20、40、50、100、200 μg/mL 的混合梯度稀释液，经 0.22 μm 滤膜过滤后，按照 1.3.2 的色谱条件进样检测，以酚酸化合物的质量浓度为横坐标、色谱峰的峰面积为纵坐标绘制标准曲线。以最低质量浓度的标准品溶液进样，当信噪比为 3 时，测得 LOD；当信噪比为 10 时，测得 LOQ。

1.3.4 发芽黑小麦的制备

称取 50 g 黑小麦种子，用自来水淋洗 5 遍，沥干后按 1 g∶6 mL 的料液比加入自来水，室温浸泡 8 h。浸泡结束后，将黑小麦种子沥出，置于底部有孔的发芽盒中，于恒温恒湿培养箱（温度 25 ℃、相对湿度 85%）中避光发芽，每隔 8 h 浇水 1 次，每次 100 mL。在发芽后的第 1、3、5、7 天取样，以未经任何处理的黑小麦种子为未发芽黑小麦对照组。样品收取后置于-80 ℃超低温冰箱中冷冻 12 h，再转移至真空冷冻干燥机中干燥，冻干后粉碎过 60 目筛备用。

1.3.5 酚酸化合物提取条件的优化

1）提取溶剂体积分数的选择：取 5 个 50 mL 离心管，分别精确称取发芽第 5 天的黑小麦粉 1.00 g，各加入 15 mL 体积分数为 60%、70%、80%、90%、100% 的甲醇溶液，涡旋提取 6 min，于 5 000 r/min 离心 5 min；取上清液过滤，沉淀中再分别加入 15 mL 体积分数为 60%、70%、80%、90%、100% 的甲醇溶液，重复上述步骤；合并 2 次上清液，于 55 ℃旋转蒸发浓缩至 2 mL，经 0.22 μm 滤膜过滤后，按照 1.3.2 的色谱条件进样检测，以测出的 11 种酚酸化合物总质量分数为指标，确定适宜体积分数的甲醇溶液作为提取溶剂。

2）涡旋提取时间的确定：取 5 个 50 mL 离心管，分别精确称取发芽第 5 天的黑小麦粉 1.00 g，各加入 15 mL 体积分数为 80% 的甲醇溶液，以 2、4、6、8、10 min 为涡旋提取时间，于 5 000 r/min 离

心5 min；取上清液过滤，沉淀中再加入15 mL体积分数为80%的甲醇溶液，重复上述步骤；合并2次上清液，于55 ℃旋转蒸发浓缩至2 mL，经0.22 μm滤膜过滤后，按照1.3.2的色谱条件进样检测，以测出的11种酚酸化合物总质量分数为指标，确定适宜的涡旋提取时间。

3）料液比的确定：取5个50 mL离心管，分别精确称取发芽第5天的黑小麦粉1.00 g，按照料液比1 g∶10 mL、1 g∶20 mL、1 g∶30 mL、1 g∶40 mL、1 g∶50 mL，先分别加入5、10、15、20、25 mL体积分数为80%的甲醇溶液，涡旋提取6 min，于5 000 r/min离心5 min；取上清液过滤，沉淀中再分别加入5、10、15、20、25 mL体积分数为80%的甲醇溶液，重复上述步骤；合并2次上清液，于55 ℃旋转蒸发浓缩至2 mL，经0.22 μm滤膜过滤后，按照1.3.2的色谱条件进样检测，以测出的11种酚酸化合物总质量分数为指标，确定适宜的料液比。

1.3.6　样品中酚酸化合物的测定

1）样品溶液制备：精确称取发芽黑小麦粉1.00 g于50 mL离心管中，先加入15 mL甲醇，涡旋提取6 min，于5 000 r/min离心5 min；取上清液过滤，沉淀中再加入15 mL甲醇，重复上述步骤；合并2次上清液，于55 ℃旋转蒸发浓缩至2 mL，经0.22 μm滤膜过滤后，按照1.3.2的色谱条件进样检测。

2）质量分数计算：按照上述方法测定样品中各酚酸化合物的质量浓度，并根据式（1）计算样品中所测酚酸化合物的质量分数，结果以3次平行试验的算术平均值表示。

$$\omega = \rho \times \frac{v}{m} \tag{1}$$

式中：

ω——样品中所测酚酸化合物的质量分数，μg/g；

ρ——将峰面积代入标准曲线得出的样品溶液中所测成分的质量浓度，μg/mL；

v——提取溶剂的体积，mL；

m——样品的质量，g。

1.3.7　方法学验证

1）精密度试验：按照1.3.3的方法制备混合标准品母液，吸取质量浓度为100 μg/mL的没食子酸、原儿茶酸、对羟基苯甲酸、绿原酸、香草酸、咖啡酸、丁香酸、对香豆酸、阿魏酸、芥子酸和水杨酸混合标准品母液于1.3.2的色谱条件下进样检测，进样体积10 μL，重复进样6次，根据各酚酸化合物所对应色谱峰的峰面积计算RSD。

2）重复性试验：称取同一批发芽第5天的黑小麦粉6份，每份1.00 g，按照1.3.6的方法制备样品溶液，并于1.3.2的色谱条件下测定11种酚酸化合物，根据各酚酸化合物所对应色谱峰的峰面积计算RSD。

3）稳定性试验：称取同一批发芽第5天的黑小麦粉3份，按照1.3.6的方法制备样品溶液，并将制备好的样品溶液在24 h内每4 h进样检测1次，根据样品中11种酚酸化合物所对应色谱峰的峰面积计算RSD。

4）加标回收率试验：称取同一批发芽第5天的黑小麦粉3份，每份1.00 g，按照1.3.6的方法制备样品溶液，并于1.3.2的色谱条件下测定11种酚酸化合物质量分数。再称取9份1.00 g发芽黑小麦粉，每3份为1组，分高、中、低3个等级加入混合标准品溶液，再按照1.3.6的方法制备样品溶液，并于1.3.2的色谱条件下进样检测，计算平均加标回收率。

1.4　数据处理

采用Excel 2019和IBM SPSS statistics 25进行数据处理，采用Origin 2021软件进行绘图。

2　结果与讨论

2.1　色谱分析方法的确定

2.1.1　检测波长

采用紫外-可见光分光光度计分别对11种酚酸化合物的标准品溶液进行全波长扫描，结果表明，11种酚酸化合物均在248、280 nm处有较强的紫外吸收，而采用248 nm作为检测波长时，色谱峰出现倒峰，且基线不稳，经多次试验后最终确定以280 nm作为检测波长。

2.1.2　流动相

比较了甲醇-水（含体积分数0.1%乙酸）、乙腈-水（含体积分数0.1%乙酸）、甲醇-水（含体积分数0.1%磷酸）和乙腈-水（含体积分数0.1%磷酸）作为流动相时11种酚酸化合物的出峰情况以及分离效果。结果表明，以乙腈-水（含体积分数0.1%磷酸）和乙腈-水（含体积分数0.1%乙酸）为流动相时，香草酸、咖啡酸、丁香酸分离度低。以甲醇-水（含体积分数0.1%磷酸）为流动相时，芥子酸和阿魏酸色谱峰出现重叠；而以甲醇-水（含体积分数0.1%乙酸）为流动相时，各酚酸化合物所对应的色谱峰分

离度较好。在此基础上，增加水相中乙酸的体积分数。结果表明，当水相中乙酸体积分数达到1%时，各酚酸化合物色谱峰能实现基线分离。为进一步优化峰形，在有机相中加入乙酸。结果显示，当有机相和水相中乙酸的体积分数均为1%时，各酚酸化合物分离度较好，峰形对称且无拖尾现象。通过梯度洗脱来优化峰形，缩短洗脱时间，得到最佳梯度洗脱程序，如表1所示。

表1 梯度洗脱程序

Table 1 Gradient elution procedure

时间/min	流动相A体积分数/%	流动相B体积分数/%
0	8	92
10	10	90
23	30	70
38	33	67
45	50	50

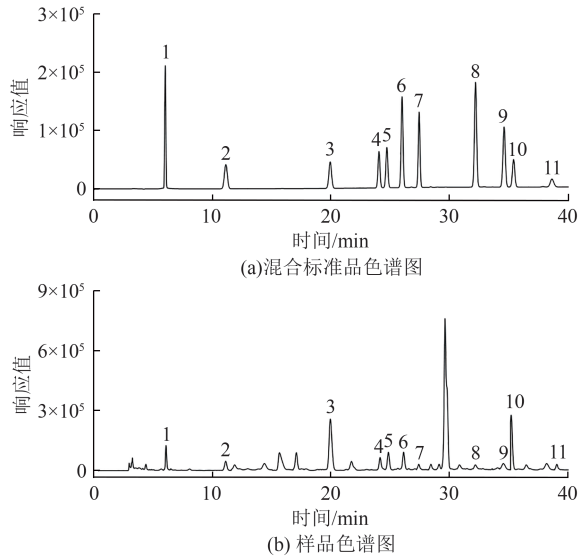
2.2 线性关系考察

11种酚酸化合物的线性关系考察结果见表2。在质量浓度为20~200 μg/mL时，11种酚酸化合物质量浓度与峰面积的线性关系良好，R^2≥0.999 4（n=6），LOD≥1.22 μg/mL，LOQ≥2.54 μg/mL。质量浓度为100 μg/mL的混合标准品和样品色谱图见图1。

表2 11种酚酸化合物的线性方程、线性范围、R^2、LOD和LOQ

Table 2 Linear equations, linear ranges, R^2, LOD, and LOQ of 11 phenolic acids

酚酸化合物	线性方程	线性范围/（μg/mL）	R^2	LOD/（μg/mL）	LOQ/（μg/mL）
没食子酸	y=14 852x+39 296	20~200	0.999 4	2.24	3.60
原儿茶酸	y=7 774.1x−3 945.3	20~200	0.999 9	1.85	4.98
对羟基苯甲酸	y=7 445.9x−1 369.2	20~200	0.999 9	1.89	5.87
绿原酸	y=7 800.9x−3 875.9	20~200	0.999 9	1.43	3.61
香草酸	y=8 696.4x−3 845.4	20~200	0.999 9	1.73	5.28
咖啡酸	y=18 745x−12 244	20~200	0.999 9	1.22	2.54
丁香酸	y=14 099x−1 292.7	20~200	0.999 8	1.99	6.42
对香豆酸	y=24 521x−12 681	20~200	0.999 9	1.69	4.43
阿魏酸	y=15 385x−9 803.7	20~200	0.999 9	1.84	6.45
芥子酸	y=7 127.8x−5 224.1	20~200	0.999 9	2.04	5.09
水杨酸	y=3 001.7x−2 842.5	20~200	0.999 9	4.34	7.50



1—没食子酸；2—原儿茶酸；3—对羟基苯甲酸；4—绿原酸；5—香草酸；6—咖啡酸；7—丁香酸；8—对香豆酸；9—阿魏酸；10—芥子酸；11—水杨酸。

图1 混合标准品和样品色谱图

Fig. 1 Chromatograms of mixed standard and sample

2.3 酚酸化合物提取条件的确定

2.3.1 提取溶剂体积分数

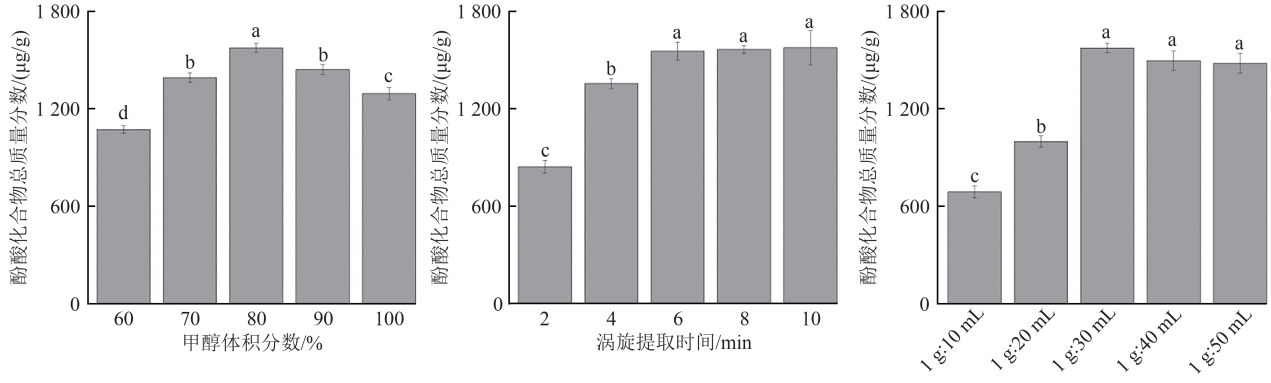
甲醇作为提取溶剂对酚酸化合物的提取效果较好[25-27]，但是不同体积分数的甲醇溶液由于极性不同所提取的酚酸化合物种类也不同。由图2（a）可知，甲醇的体积分数对酚酸化合物的提取效果有较大影响，当甲醇体积分数较低时，所测11种酚酸化合物总质量分数较低。当甲醇体积分数为60%~80%时，酚酸化合物总质量分数随着甲醇体积分数的升高而增加；当甲醇体积分数为80%时，酚酸化合物总质量分数达到最高点；随着甲醇体积分数的继续升高，酚酸化合物总质量分数呈现下降的趋势，可能是较高体积分数的甲醇溶液可溶出更多的醇溶性杂质，从而限制了酚酸化合物的溶出。因此，最终确定以体积分数为80%的甲醇溶液作为提取溶剂，这与黄小兰等[28]的优化结果一致。

2.3.2　涡旋提取时间

如图2(b)所示，涡旋提取时间为2~6 min时，随着涡旋提取时间的延长，所测11种酚酸化合物总质量分数呈上升趋势，但涡旋提取时间超过6 min后，所测11种酚酸化合物总质量分数随着涡旋提取时间的延长而无显著增加(P≥0.05)，说明涡旋提取6 min时，11种酚酸化合物已完全溶于提取溶剂中。因此，确定6 min为适宜的涡旋提取时间。

2.3.3　料液比

在确定的适宜提取溶剂及涡旋提取时间的基础上，进一步研究了料液比对发芽黑小麦中11种酚酸化合物总质量分数的影响，结果如图2(c)所示。当料液比为1 g∶30 mL时，提取的11种酚酸化合物总质量分数最高。提取溶剂使用过少时，酚酸化合物溶解不完全。而当料液比为1 g∶30 mL、1 g∶40 mL、1 g∶50 mL时，随着提取溶剂的增加，所测11种酚酸化合物总质量分数变化不显著(P≥0.05)，这是因为在达到一定的料液比后，发芽黑小麦中大部分目标成分已经溶出，此时再增加提取溶剂的用量，对其所提取出的酚酸化合物总质量分数影响不大，这与洪昕[29]对蒲公英中多酚的提取优化结果相似。因此，最终确定以1 g∶30 mL为适宜的料液比。



(a) 甲醇体积分数对酚酸化合物总质量分数的影响　(b) 涡旋提取时间对酚酸化合物总质量分数的影响　(c) 料液比对酚酸化合物总质量分数的影响

不同小写字母表示组间差异显著(P<0.05)。

图2　甲醇体积分数、涡旋提取时间及料液比对11种酚酸化合物总质量分数的影响

Fig. 2　Effects of methanol volume fraction, vortex extraction time, and solid-liquid ratio on the total mass fraction of 11 phenolic acids

2.4　方法学验证结果

如表3所示，所测11种酚酸化合物色谱峰的峰面积RSD均低于2.00%，表明仪器精密度和重复性良好，且该方法所提取的样品溶液在24 h内稳定性良好。样品中各酚酸化合物的质量分数及加标回收率测定结果见表4，所测11种酚酸化合物的平均加标回收率为98.02%~101.12%，且RSD均低于2.00%，表明提取方法及测定方法准确度良好。

2.5　发芽黑小麦中11种酚酸化合物质量分数

如表5所示，未经任何处理的黑小麦中未检测出没食子酸；发芽第1~3天，没食子酸质量分数显著增加(P<0.05)，并在第3天达到峰值，为(113.82±2.92) μg/g；而后随着发芽时间延长，没食

表3　精密度、重复性及稳定性验证结果

Table 3　Precision, repeatability, and stability verification results

酚酸化合物	峰面积RSD/%		
	精密度试验	重复性试验	稳定性试验
没食子酸	0.74	1.88	1.88
原儿茶酸	0.63	1.81	1.81
对羟基苯甲酸	0.63	1.03	1.03
绿原酸	0.49	1.09	1.09
香草酸	0.59	1.89	1.89
咖啡酸	0.42	1.58	1.58
丁香酸	0.68	1.59	1.59
对香豆酸	0.58	1.88	1.88
阿魏酸	0.63	1.73	1.73
芥子酸	0.70	1.73	1.73
水杨酸	1.44	1.89	1.89

表 4　样品中酚酸化合物质量分数及加标回收率

Table 4　Mass fractions and spiked recovery rates of phenolic acids in samples

酚酸化合物	样品中酚酸化合物质量分数/（μg/g）	加入量/μg	测得量/（μg/g）	加标回收率/%	平均加标回收率/%	RSD/%
没食子酸	47.57	20	68.08	102.54	100.54	1.92
		40	87.05	98.71		
		60	107.78	100.36		
原儿茶酸	84.73	40	124.80	100.18	98.89	1.69
		80	162.31	96.98		
		120	204.15	99.52		
对羟基苯甲酸	469.07	200	662.92	96.92	98.48	1.55
		400	863.03	98.49		
		600	1 069.24	100.03		
绿原酸	82.42	40	121.94	98.81	98.82	1.22
		80	160.50	97.60		
		120	202.47	100.05		
香草酸	72.57	35	107.67	100.30	100.82	1.51
		70	144.33	102.51		
		105	177.19	99.64		
咖啡酸	35.84	15	51.06	101.48	100.14	1.42
		30	65.44	98.66		
		45	80.96	100.28		
丁香酸	168.13	80	245.45	96.65	98.02	1.24
		160	325.53	98.37		
		240	405.85	99.05		
对香豆酸	35.28	15	50.40	100.78	100.68	1.98
		30	66.06	102.60		
		45	79.67	98.65		
阿魏酸	71.52	35	107.13	101.74	100.20	1.33
		70	141.11	99.42		
		105	175.93	99.43		
芥子酸	352.72	150	505.97	102.16	101.12	1.28
		300	657.18	101.49		
		450	801.35	99.70		
水杨酸	160.66	80	238.01	96.68	98.64	1.71
		160	320.32	99.79		
		240	399.37	99.46		

子酸质量分数呈下降趋势。随着发芽时间的延长，原儿茶酸和丁香酸质量分数均呈增长趋势；香草酸、对香豆酸和阿魏酸质量分数在发芽第 1 天最高，分别为（180.00±6.85）、（67.63±3.23）、（105.22±0.53）μg/g；对羟基苯甲酸、芥子酸和水杨酸质量分数均在发芽第 5 天最高，分别为（469.07±28.38）、（352.72±0.62）、（160.66±1.43）μg/g；在发芽第 1~5 天，11 种酚酸化合物总质量分数显著增加（P<0.05），在发芽第 5 天最高，为（1 580.52±35.47）μg/g，是未发芽黑小麦对照组的 2.13 倍，发芽第 7 天又有所下降。

发芽处理对黑小麦中酚酸化合物的富集有明显的促进作用，在发芽第 1 天，黑小麦中 11 种酚酸化合物总质量分数与未发芽黑小麦对照组相比，无显著性差异（P≥0.05）；随着发芽时间的延长，黑小麦中 11 种酚酸化合物总质量分数显著增加，特

别在发芽第3~5天，增幅较大。在发芽第5天，对羟基苯甲酸和芥子酸质量分数占比较高，这可能是由于发芽处理提高了黑小麦中内源酶的活力，从而促进了酚酸化合物等生物活性物质的合成，这与汪昱柯等[30]对不同品种的发芽糙米中酚类物质的富集机制研究结果相符。而到了发芽第7天，没食子酸、对羟基苯甲酸、芥子酸和水杨酸质量分数下降，其余酚酸化合物质量分数均呈持续上升的趋势。谷物经发芽处理后，其酚酸化合物的组成、含量和存在形式均发生改变[31]。植物细胞中酚酸化合物的组成和含量受到植物品种、发育阶段、环境胁迫等诸多因素的影响，而不同酚酸化合物的结构和功能不同[32-33]，因此需结合多种因素进一步研究发芽黑小麦中酚酸化合物质量分数的变化。

表5　发芽时间对黑小麦中11种酚酸化合物质量分数的影响

Table 5　Effects of germination time on the mass fractions of 11 phenolic acids in black wheat

酚酸化合物	质量分数/(μg/g)				
	第0天	第1天	第3天	第5天	第7天
没食子酸	ND	12.88±2.40^{d}	113.82±2.92^{a}	47.57±0.46^{b}	39.60±2.52^{c}
原儿茶酸	35.45±2.57^{d}	59.58±7.83^{c}	71.82±2.73^{b}	84.73±5.68^{a}	94.74±2.27^{a}
对羟基苯甲酸	13.17±0.11^{c}	17.41±1.14^{c}	79.04±3.29^{b}	469.07±28.38^{a}	452.10±31.11^{a}
绿原酸	197.50±13.27^{a}	33.00±1.28^{d}	188.02±2.89^{a}	82.42±5.72^{c}	100.67±6.80^{b}
香草酸	56.45±4.40^{d}	180.00±6.85^{a}	34.30±4.57^{e}	72.57±4.99^{c}	86.22±3.81^{b}
咖啡酸	33.51±0.93^{c}	63.04±4.41^{b}	57.47±1.17^{b}	35.84±2.22^{c}	69.46±1.27^{a}
丁香酸	25.84±2.03^{e}	51.70±4.91^{d}	69.17±1.43^{c}	168.13±4.42^{b}	178.26±2.41^{a}
对香豆酸	39.66±1.62^{bc}	67.63±3.23^{a}	25.21±0.44^{d}	35.28±1.75^{c}	42.64±1.90^{b}
阿魏酸	31.22±1.53^{d}	105.22±0.53^{a}	55.78±2.51^{c}	71.52±5.57^{b}	72.00±3.07^{b}
芥子酸	179.08±8.75^{c}	87.69±4.05^{d}	183.72±6.75^{c}	352.72±0.62^{a}	235.25±3.64^{b}
水杨酸	131.12±7.91^{b}	134.35±7.91^{b}	139.85±15.05^{ab}	160.66±1.43^{a}	86.24±2.11^{c}
总酚酸化合物	743.00±43.13^{d}	812.51±44.54^{d}	1 018.20±34.61^{c}	1 580.52±35.47^{a}	1 457.16±60.92^{b}

注：第0天表示未发芽黑小麦对照组；ND表示未检测到；同一行不同小写字母表示差异显著（P<0.05）。

3　结论

作者探究了不同提取条件对发芽黑小麦中11种酚酸化合物（没食子酸、原儿茶酸、对羟基苯甲酸、绿原酸、香草酸、咖啡酸、丁香酸、对香豆酸、阿魏酸、芥子酸和水杨酸）总质量分数的影响，并建立了使用HPLC快速测定11种酚酸化合物的方法，可以同时对发芽黑小麦中11种酚酸化合物进行测定及定量分析。发芽处理可以促进黑小麦中没食子酸的生成，随着发芽时间的延长，黑小麦中的没食子酸质量分数在第3天达到峰值，为（113.82±2.92）μg/g；11种酚酸化合物总质量分数在发芽第5天最高，为（1 580.52±35.47）μg/g，是未发芽黑小麦对照组的2.13倍，这表明发芽处理能改变黑小麦中酚酸化合物的质量分数。该方法具有较高的精密度、重复性和稳定性，且简便快速，可用于发芽谷物中上述11种酚酸化合物的定量分析，为后续黑小麦中功能活性成分的深入研究和质量分析提供参考。

参考文献

[1] 牛新奎，韩小贤，郑学玲. 黑小麦粉的抗氧化成分及活性[J]. 现代食品科技，2022，38(9)：292-297.
NIU X K，HAN X X，ZHENG X L. Antioxidant components and activity of *Triticum aestivum* flour[J]. Modern Food Science and Technology，2022，38(9)：292-297.(in Chinese)

[2] 满朝坤. 五种颜色糙米多酚类物质抗氧化活性及体外消化特性研究[D]. 沈阳：沈阳师范大学，2020.

[3] 牛新奎. 黑小麦粉及其面条制品品质与抗氧化性研究[D]. 郑州：河南工业大学，2022.

[4] SINGH A，BOBADE H，SHARMA S，et al. Enhancement of digestibility of nutrients (*in vitro*)，antioxidant potential and functional attributes of wheat flour through grain germination[J]. Plant Foods for Human Nutrition，2021，76(1)：118-124.

[5] HEFNI M，WITTHÖFT C M. Effect of germination and subsequent oven-drying on folate content in different wheat and rye cultivars[J]. Journal of Cereal Science，2012，56(2)：374-378.

[6] FOGARASI A L，KUN S，TANKÓ G，et al. A

comparative assessment of antioxidant properties, total phenolic content of einkorn, wheat, barley and their malts [J]. Food Chemistry, 2015, 167: 1-6.

[7] 李小东, 李倩, 张悦瑶, 等. 发芽对黑小麦营养成分的影响[J]. 中国粮油学报, 2025, 40(2): 58-67.
LI X D, LI Q, ZHANG Y Y, et al. Effect of germination on nutritional components of black wheat[J]. Journal of the Chinese Cereals and Oils Association, 2025, 40(2): 58-67.(in Chinese)

[8] 刘瑞, 于章龙, 柴永峰, 等. 粮谷及其发芽物质变化研究进展[J]. 食品工业科技, 2019, 40(13): 293-298.
LIU R, YU Z L, CHAI Y F, et al. Research advances of substances variation in grain and germinated grain[J]. Science and Technology of Food Industry, 2019, 40(13): 293-298.(in Chinese)

[9] 甘人友, 隋中泉, 杨琼琼, 等. 发芽提高黑小麦可溶性和结合性提取物的抗氧化活性和多酚含量[J]. 上海交通大学学报(农业科学版), 2017, 35(3): 1-9.
GAN R Y, SUI Z Q, YANG Q Q, et al. Enhancement of antioxidant capacity and phenolic content in soluble and bound extracts of germinated black wheat[J]. Journal of Shanghai Jiaotong University (Agricultural Science), 2017, 35(3): 1-9.(in Chinese)

[10] 陈金祥. 酚酸抗氧化活性的构效关系及抗氧化机制的研究[D]. 太原: 中北大学, 2020.

[11] 赵霞. 热加工和发芽处理对燕麦多酚含量和抗氧化性的影响[D]. 无锡: 江南大学, 2016.

[12] 吴凡, 王展, 周坚, 等. 干燥方式对挤压麸皮理化性质和抗氧化活性的影响[J]. 食品与机械, 2022, 38(6): 67-72.
WU F, WANG Z, ZHOU J, et al. The effect of drying method on the physical and chemical properties and antioxidant activity of extruded wheat bran[J]. Food & Machinery, 2022, 38(6): 67-72.(in Chinese)

[13] 马茜, 张渌淘, 禄璐, 等. 宁夏枸杞酚类及其衍生物的研究与应用进展[J]. 食品科学, 2024, 45(17): 316-325.
MA Q, ZHANG L T, LU L, et al. Progress in research and application of phenols and their derivatives from *Lycium barbarum* L.[J]. Food Science, 2024, 45(17): 316-325.(in Chinese)

[14] 赵飞亚, 卢熙奎, 张铃声, 等. 鼠尾草属民族药物资源、化学成分及药理活性研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2024, 30(16): 272-283.
ZHAO F Y, LU X K, ZHANG L S, et al. Medicinal resources, chemical constituents, and pharmacological activities of *Salvia* genus: a review[J]. Chinese Journal of Experimental Traditional Medical Formulae, 2024, 30(16): 272-283.(in Chinese)

[15] 张驰, 田富林, 金舟, 等. 酚酸生物活性研究进展[J]. 粮食与油脂, 2023, 36(5): 4-7.
ZHANG C, TIAN F L, JIN Z, et al. Research progress on biological activity of phenolic acids[J]. Cereals & Oils, 2023, 36(5): 4-7.(in Chinese)

[16] 王婧, 宋莲军, 马燕, 等. 豌豆多酚的组成、提取和生理活性的研究进展[J]. 食品工业科技, 2022, 43(23): 418-428.
WANG J, SONG L J, MA Y, et al. Research progress on composition, extraction and physiological activity of pea polyphenols [J]. Science and Technology of Food Industry, 2022, 43(23): 418-428.(in Chinese)

[17] DYKES L, ROONEY L W. Phenolic compounds in cereal grains and their health benefits[J]. Cereal Foods World, 2007, 52: 105-111.

[18] GANGOPADHYAY N, HOSSAIN M B, RAI D K, et al. A review of extraction and analysis of bioactives in oat and barley and scope for use of novel food processing technologies[J]. Molecules, 2015, 20(6): 10884-10909.

[19] SALAWU S O, BESTER M J, DUODU K G. Phenolic composition and bioactive properties of cell wall preparations and whole grains of selected cereals and legumes[J]. Journal of Food Biochemistry, 2014, 38(1): 62-72.

[20] 逯红林, 赵亚芸, 沈海涛, 等. UPLC-MS/MS法同时测定天山茶藨茎14个酚类成分及其降血糖活性[J]. 药物分析杂志, 2021, 41(10): 1697-1706.
LU H L, ZHAO Y Y, SHEN H T, et al. Simultaneous determination of 14 phenols from *Ribes meyeri* stem by UPLC-MS/MS and their antidiabetic activity[J]. Chinese Journal of Pharmaceutical Analysis, 2021, 41(10): 1697-1706.(in Chinese)

[21] 李慧玲, 单丽红. 定量核磁共振技术测定注射用丹参多酚酸中咖啡酸、丹参素、原儿茶酸和阿魏酸[J]. 药物评价研究, 2023, 46(8): 1686-1690.
LI H L, SHAN L H. Determination of caffeic acid, danshensu, protocatechuic acid and ferulic acid in salvianolic acids for injection by quantitative nuclear magnetic resonance [J]. Drug Evaluation Research, 2023, 46(8): 1686-1690.(in Chinese)

[22] 王淑芳, 董飞, 王刚, 等. 小麦酚酸提取工艺优化及产区与品种差异对酚酸含量的影响[J]. 食品科学, 2019, 40(22): 306-312.
WANG S F, DONG F, WANG G, et al. Optimization of extraction process for phenolic acid from wheat grains and effect of geographic origin and variety on phenolic acid

content[J]. Food Science，2019，40(22)：306-312.(in Chinese)

[23] 曹众富. 全谷物米粉多酚抗氧化活性研究[D]. 长沙：长沙理工大学，2022.

[24] 黄永健，荀航，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 Y J，XUN H，ZHANG B，et al. Simultaneous determination of eight phenolic acids in bamboo shoots by HPLC and its applications[J]. Journal of Nanjing Forestry University (Natural Sciences Edition)，2024，48(3)：237-244.(in Chinese)

[25] 孙博，霍华珍，蔡爱华，等. HPLC法测定大果山楂果实中八种酚酸类成分的含量[J]. 广西植物，2021，41(7)：1135-1144.
SUN B，HUO H Z，CAI A H，et al. Determination of contents of eight phenolic acids in *Malus doumeri* fruit by HPLC[J]. Guihaia，2021，41(7)：1135-1144.(in Chinese)

[26] 余菲，赵晓燕，周昌艳，等. 不同品种生菜的多酚、黄酮差异比较与抗氧化活性[J]. 食品科学，2024，45(13)：17-25.
YU F，ZHAO X Y，ZHOU C Y，et al. Comparison of polyphenols，flavonoids and antioxidant activities of different varieties of lettuce[J]. Food Science，2024，45(13)：17-25.(in Chinese)

[27] 邹真，王成龙，庞林江，等. 交变电场对储藏中毛油氧化及酚酸的影响[J]. 中国粮油学报，2024，39(5)：29-36.
ZOU Z，WANG C L，PANG L J，et al. Effects of alternating electric field on crude oil oxidation and phenolic acid in storage[J]. Journal of the Chinese Cereals and Oils Association，2024，39(5)：29-36.(in Chinese)

[28] 黄小兰，何旭峰，杨勤，等. HPLC-PDA同时测定地笋中7种酚酸的含量[J]. 中国实验方剂学杂志，2020，26(15)：156-162.
HUANG X L，HE X F，YANG Q，et al. Simultaneous determination of 7 phenolic acids in *Lycopus lucidus* var. *hirtus* rhizome by HPLC-PDA[J]. Chinese Journal of Experimental Traditional Medical Formulae，2020，26(15)：156-162.(in Chinese)

[29] 洪昕. 蒲公英菊苣酸和绿原酸提取及抗氧化活性研究[D]. 成都：西华大学，2022.

[30] 汪昱柯，王冕，王晓晴，等. 发芽对不同品种糙米γ-氨基丁酸及酚类物质累积的调控作用[J]. 食品与发酵工业，2024，50(15)：272-280.
WANG Y K，WANG M，WANG X Q，et al. Effects of germination on enrichment of gamma-aminobutyric acid and phenolic substances in different varieties of brown rice[J]. Food and Fermentation Industries，2024，50(15)：272-280.(in Chinese)

[31] 徐汇，梅新，李书艺，等. 非生物胁迫对发芽谷物多酚的影响研究进展[J]. 食品工业科技，2020，41(20)：330-335.
XU H，MEI X，LI S Y，et al. Research progress on effect of abiotic stress on polyphenols of sprouted cereal[J]. Science and Technology of Food Industry，2020，41(20)：330-335.(in Chinese)

[32] TYAGI A，SHABBIR U，CHEN X Q，et al. Phytochemical profiling and cellular antioxidant efficacy of different rice varieties in colorectal adenocarcinoma cells exposed to oxidative stress[J]. PLoS One，2022，17(6)：e0269403.

[33] VUOLO M M，LIMA V S，MARÓSTICA J M R. Phenolic compounds：structure，classification，and antioxidant power[M]//SEGURA-CAMPOS M R. Bioactive compounds：health benefits and potential applications. Cambridge，Woodhead Publishing，2019：33-50.

（责任编辑：许艳超）