

橄榄油中生物酚准确定量的瓶颈及对策

束莉丹¹, 李燕艳¹, 曹文明^{1,2}

(1. 丰益(上海)生物技术研发中心有限公司, 上海 200137; 2. 上海理工大学
上海食品快速检测工程技术研究中心, 上海 200093)

摘要: 橄榄油中的生物酚是具有广泛生物活性的极其复杂的极性酚类物质, 不仅化学结构异质、性质多不稳定、异构化程度高, 而且橄榄多酚等歧义概念的长期共存, 使得生物酚始终没有理想的测定方法, 一定程度上影响了橄榄油的品质控制及贸易。为了寻求突破橄榄油中生物酚测定瓶颈的对策, 为橄榄油中生物酚的准确定量提供理论参考, 综述了多酚、酚类化合物、橄榄油多酚与生物酚等类似术语使用范围的异同, 分析了欧洲食品安全局(EFSA)关于橄榄油多酚健康声称中术语模糊、缺失适用分析方法的争议, 从裂环烯醚萜类化合物的复杂异构体与衍生物、色谱基线分离不可行、标准品缺失、单体酚法与总酚法的不兼容性 4 个方面阐述了橄榄油中生物酚准确定量的瓶颈, 并对突破瓶颈的 4 个具有潜力的研究方向进行展望, 即实现全回收率与零人工产物的直接进样法, 提升分辨力与准确性的离子淌度质谱(IM-MS), 降低基质效应与提升灵敏度的二维液相色谱(LC×LC), 加速裂环烯醚萜类标准品研制。橄榄油生物酚准确定量的瓶颈将长期存在, 方法突破有赖于更深入的基础研究与创新技术的应用。

关键词: 橄榄油; 橄榄油多酚; 生物酚; 酚类化合物; 裂环烯醚萜; 定量检测

中图分类号: TS225.1; TS227 文献标识码: A 文章编号: 1003-7969(2024)06-0136-09

Bottleneck and countermeasures of accurate quantification of biophenols in olive oil

SHU Lidan¹, LI Yanyan¹, CAO Wenming^{1,2}

(1. Wilmar (Shanghai) Biotechnology Research & Development Center Co., Ltd., Shanghai 200137, China; 2. Food Rapid Determination Engineering Technology Research Center, University of Shanghai for Science and Technology, Shanghai 200093, China)

Abstract: Biophenols in olive oil are extremely complex polar phenolic substances with a wide range of biological activities. Not only the heterogeneous in chemical structure, unstable in nature and highly isomerised, but also the long-term co-existence of ambiguous concepts, such as olive polyphenols, has resulted in the lack of an ideal method for the determination of biophenols, which has affected the quality control of olive oil and its trade to a certain extent. In order to seek countermeasures to break through the bottleneck in the determination of biophenols in olive oil and to provide theoretical references for the

收稿日期: 2023-02-25; 修回日期: 2024-02-22

基金项目: 橄榄油中酚类物质检测方法联合验证(国际橄榄油协会化学专家组 2021)(wilmar2021); 食品安全国家标准制修订项目(spaq-2020-40)

作者简介: 束莉丹(1983), 女, 工程师, 主要从事食品分析研究工作(E-mail) shulidan@cn.wilmar-intl.com; 李燕艳(1980), 女, 工程师, 硕士, 主要从事食品分析研究工作(E-mail) liyanyan1@cn.wilmar-intl.com。束莉丹与李燕艳共同为第一作者。

通信作者: 曹文明, 研究员, 博士(E-mail) caowenming@cn.wilmar-intl.com。

accurate quantification of biophenols in olive oil, the similarities and differences in the scope of use of similar terms such as polyphenols, phenolic compounds, olive oil polyphenols and biophenols were summarized, and the controversy over the ambiguity of terminology and the lack of applicable analytical methods for the health claims of olive oil polyphenols in the European Food Safety Authority (EFSA) were analysed. From the secoiridoids complex isomers and derivatives,

infeasibility of chromatographic baseline separation, lack of standards, incompatibility of phenolic monomer addition and total phenol determination, the bottleneck of accurate quantification of biophenols in olive oil were introduced, and four potential research directions for breaking through the bottlenecks, i. e., direct injection with full recovery and zero artefacts, ion mobility mass spectrometry (IM-MS) to improve resolution and accuracy, two-dimensional liquid chromatography (LC × LC) to reduce matrix effects and increase sensitivity, and accelerating development of standards for secoiridoids were prospected. The bottleneck in the accurate quantification of biophenols in olive oil will persist for a long time, and methodological breakthroughs depend on more in-depth basic research and the application of innovative technologies.

Key words: olive oil; olive oil polyphenols; biophenols; phenolic compounds; secoiridoids; quantitative determination

油橄榄 (*Olea europaea* L.), 又名齐墩果, 字面意为“欧洲橄榄”, 起源于六七千年前亚洲的古波斯和两河流域美索不达米亚 (Mesopotamia)。生活在地中海东岸的腓尼基人 (Phoenicians) 和希腊人将油橄榄树传播到西方地区^[1-2], 地中海国家已有超过 5 000 年的油橄榄种植历史^[3], 中国最大的油橄榄种植和加工基地甘肃省陇南市武都区也于 1998 年被国际橄榄理事会 (IOC) 划入世界橄榄油分布图^[4]。油橄榄树的寿命可达 1 000 年以上, 橄榄油被西方誉为“液体黄金”, 橄榄生物酚是其最主要的微量活性成分, 具有许多重要的生物学特性, 成为近年来橄榄油研究的核心^[5]。欧盟 2012 年就批准了含量不小于 250 mg/kg 橄榄油多酚的初榨橄榄油有助于保护血脂免受氧化应激的健康声称^[6-7]。橄榄油中酚类物质包含超过 36 种不同结构的化合物^[8], 特级初榨橄榄油中总酚含量范围在 50 ~ 800 mg/kg^[9], 有的油橄榄品种中酚类物质含量高达 1 240 mg/kg^[11]。虽然橄榄生物酚仅有 2% 存在于油相^[3], 却极大影响着橄榄油感官与质量属性。生物酚对特级初榨橄榄油的果味、苦味、辛辣味和涩味, 以及氧化稳定性有决定性的作用^[10], 其抗氧化特性基于自由基清除、氢原子转移、金属螯合等机制, 维

护特级初榨橄榄油的化学稳定性^[11]。另外, 生物酚还会在多酚氧化酶作用下转化为活性氧和醌, 醌会自发聚合致变色, 即发生酶促褐变^[12], 从而影响橄榄油的外观和内在品质。然而, 橄榄油中酚类物质存在多种术语与释义, 特别是欧洲食品安全局 (EFSA) 给出了健康声称中所需的“橄榄油多酚”的含量, 但未给出准确定量方法, 目前存在的其他检测方法也不能进行准确定量。因此, 生物酚准确定量的方法仍然是悬而未决的世界难题。结合在中国唯一 IOC 认可实验室中的多年研究实践, 本文从橄榄油中酚类物质的术语表述、色谱分离和定性瓶颈等方面综述了橄榄油中生物酚的研究进展, 分析准确定量面临的瓶颈, 展望瓶颈突破的若干方向, 以期深入理解橄榄油生物酚准确定量的瓶颈, 为其测定方法的突破寻求对策。

1 橄榄油中酚类物质的术语

对于橄榄油中的酚类物质, 官方文件及研究论文中一直存在多种表述, 包括多酚 (Polyphenols)、生物酚 (Biophenols)、酚类化合物 (Phenolic compounds)、橄榄油多酚 (Olive oil polyphenols)。严格意义上讲, 各术语所指示橄榄油中酚类物质的范围并不一致, 其常见术语见表 1。

表 1 橄榄油中酚类物质的常见术语

术语	包含范围	聚合物/单体	起源时间	利弊	认可度
多酚	木酚素	聚合物	1989 ^[13]	概念不够准确, 前缀 poly 会给人一种聚合性质或多羟基的不恰当印象, 不包括裂环烯醚萜、酚酸、类黄酮	多酚一词在官方文件中仍在在使用, 频度大约是生物酚的 400 倍
生物酚	裂环烯醚萜, 木酚素, 类黄酮, 酚酸	聚合物和单体	1996 ^[14]	相对精确和全面, 不包括非极性酚类, 如维生素 E	自 1996 提出以来, 使用量逐年增大, 越来越多使用生物酚取代不够准确的术语多酚

续表 1

术语	包含范围	聚合物/单体	起源时间	利弊	认可度
酚类化合物	裂环烯醚萜, 酚酸, 木酚素, 类黄酮	聚合物和单体	1972 ^[15]	包括全部酚类, 概念过于宽泛, 并且包括人工产物	使用频率较高, 范围广泛, 不仅限于橄榄油中的酚类化合物
橄榄油多酚	裂环烯醚萜	单体	2011 ^[16]	专用于 EFSA 健康声称	仅出现在 EFSA 健康声称中

2 EFSA 橄榄油多酚健康声称的争议

特级初榨橄榄油对健康的影响, 早期主要归因于油酸的存在, 后来注意力集中于酚类物质上。酚类物质是一类具有生物活性的化合物, 包括酚酸、类黄酮、木酚素、酚醇及裂环烯醚萜类化合物^[17]。2011年, EFSA 发布了关于橄榄油多酚类化合物对保护血脂免受氧化应激作用的健康声称, 并规定了每 20 g 橄榄油至少含有 5 mg 羟基酪醇及其衍生物的初榨橄榄油才能达到此健康功效^[6]。然而, 这个欧盟法规发布以来一直饱受争议, 几乎未被市场和学界采用, 问题不仅仅是其采用模糊的术语、范围界定不清晰, 还涉及适用分析方法的缺失。

首先, 健康声称中的橄榄油 (Olive oil) 并不对应于任何一种食用橄榄油分类, 苦苷和女贞苷衍生物丰富的初榨橄榄油 (Virgin olive oil) 应是更准确的措辞。其次, 多酚与裂环烯醚萜类化合物的基本结构不符合, 并非声称中所指向的羟基酪醇及其衍生物, 不如用初榨橄榄油生物活性酚 (Virgin olive oil bioactive phenols)^[18]。再次, 该法规中没有特别建议或采用检测每 20 g 橄榄油中 5 mg 羟基酪醇及其衍生物的标准方法, 也未指明在 30 多种已知的橄榄油酚类物质中, 应检测哪些活性酚单体化合物进行累加总计。作为候选的 IOC 的官方方法^[19-20], 由于无法实现酚类物质的色谱分离和标准品的缺失, 不足以被采用。目前针对这些问题研究的局限性, 橄榄油多酚的健康潜力仍然存在争议^[21]。

EFSA 官方文件中所采用的不明确的术语和分析方法漏洞, 给市场上健康声称的执行带来沉重的负担。发布后不久, IOC 就公开呼吁寻找适合健康声称目的的方法, 却始终没有提出任何解决方案。直到 2022 年, IOC 终于在 2017 版 IOC 方法标准基础上, 颁布了新方法标准 IOC: COL/T. 20/Doc. No 29/Rev. 2, 并称新方法 (第 2 法) 可用于测定橄榄油中酚类物质的真实浓度, 满足 EFSA 的要求, 以及单个酚类物质的含量 (例如刺激醛和油精)。但 2022 版 IOC 新方法尚未得到学术界广泛认同, 至今未见一篇经同行评议发表的包含标准中方法 2 联合验证测试数据的文章解释固相萃取 (SPE) 与液液萃取 (LLE) 的对比结果, 特别是选择二醇 SPE 柱进行多酚分离的

优势效果。事实上, 方法 2 酚类物质提取条件与 20 多年前西班牙 Mateos 等^[22]的方案几乎一致, 二醇 SPE 柱相对 LLE 并无优势。

丰益 (上海) 生物技术研发中心有限公司作为参加该 2022 版 IOC 方法国际联合验证的全球 20 家 IOC 认证实验室之一, 收到 5 个比对测试样品, 最终测定结果有效的实验室有 11 家, 近一半淘汰率, 进入统计的实验室中, 仍出现 1 ~ 2 个离群值, 这表明该新方法的一致性并不理想。

新版 IOC 方法未被广泛认同的背后是存在科学性漏洞, 给出的反相高效液相色谱 - 二极管阵列检测器 (RP-HPLC-DAD) 方法并未清晰应计入哪些酚类化合物。在 IOC 组织的国际实验室间研究中, 要求对香草酸、香兰素、阿魏酸、松树脂醇、肉桂酸、1-乙酰氧基苯胺树脂醇、木犀草素、芹菜素等 15 种化合物进行累加给出总酚含量 (mg/kg) 的精确数据, 忽视了健康声称所要求的是每 20 g 橄榄油中含有 5 mg 羟基酪醇及其衍生物 (如橄榄苦苷复合物和酪醇), 误将其中 8 种酚酸、木酚素等非裂环烯醚萜类化合物归入。甚至, 在标准中将 Oleacein (油精) 误用为 Oleoscein。橄榄油生物酚准确定量科学方法的缺失, 无疑是橄榄油中生物酚 EFSA 健康声称争议和应用局限的症结。

3 橄榄油中生物酚准确定量的瓶颈

初榨橄榄油的极性提取物中存在极其复杂的苦苷苷元和女贞苷苷元异构体及衍生物, 尤其是众多微量组分, 使得色谱峰异常杂乱, 橄榄油中酚类物质准确定量的几个瓶颈如下。

3.1 复杂而稳定性不佳的衍生物与异构体

酚酸、木酚素、类黄酮的测定相对容易, 结构复杂且含量丰富的裂环烯醚萜类是真正的分析瓶颈, 表现在以下几个方面。

3.1.1 假象人工产物的干扰

橄榄油酚类物质提取过程中假象人工产物的干扰, 如在样品制备中, 最常用的是不同比例的甲醇水作提取液, 而使用质子溶剂或在液相中作为流动相时, 油精和刺激醛易在提取和液相色谱 - 质谱 (LC-MS) 运行中形成人工产物^[23]。甲醇提取物的超高效液相色谱 - 高分辨率质谱/质谱 (UHPLC-HRMS/

MS) 揭示了所有裂环烯醚萜类化合物的二甲基缩醛、甲基半缩醛和一水化衍生物,如图 1 所示。这些裂环烯醚萜类化合物的人工产物通常是在甲醇-水溶液提取和分析初榨橄榄油酚类中形成的。人工产物使得高效液相色谱(HPLC)图更加复杂,测量的准确性和可重复性较差^[24]。因此,酚类提取物的不完全表征,会导致结果的不一致,甚至可相差几个数量级。

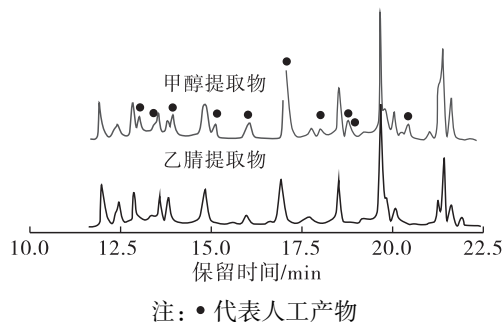


图 1 甲醇提取物中裂环烯醚萜的人工产物的 UHPLC 图

3.1.2 异构体的共存

在酚类物质提取过程中,裂环烯醚萜类化合物橄榄苦苷和女贞苷会发生异构化、脱糖苷,形成大量酚类同系物^[25]。橄榄苦苷昔元和女贞苷昔元存在许多异构体和衍生物,这两种昔元对应不稳定的环半缩醛,在橄榄油或非水相基质中难以存在^[11],主要通过重排转化为更稳定的封闭环单醛形式^[26],而其他立体异构体在色谱纯化或分析过程中操作引入^[27]。具有封闭环单醛形式的橄榄苦苷昔元和女贞苷昔元,通过酮式烯醇式互变异构自发转化为更稳定的开放双醛结构,即刺激醛和油精^[17]。橄榄苦苷昔元和女贞苷昔元还可通过酶和/或化学降解过程,失去 C10 上的羧甲基部分,得到脱羧甲基橄榄苦苷昔元和脱羧甲基女贞苷昔元,两种昔元异构衍生化过程复杂多变,进而影响生物酚的准确定量。

3.1.3 新异构体待认知

裂环烯醚萜类化合物以多种昔元形式存在,在色谱运行过程中也容易发生多种平衡转化,这些平衡转化可能导致原结构的改变,大大增加了其测定的复杂性。如报道的 Oleokoronal 和 Oleomissional 两种橄榄油中的裂环烯醚萜衍生物,在正相或反相色谱中都会转化为已知形式的单醛环昔元,它们是通过筛查多个品种共 2 000 个橄榄油样品后被鉴定出来的。事实上,大多数假定的结构还没有被分离和解析^[11]。

3.2 色谱基线分离难

福林比色法是低灵敏度的粗定量总酚的技术,为了获得更高准确性的定量,酚类细分组分的分离分析需求增加。至 20 世纪 70 年代,纸色谱可以分离 20 多个酚类物质^[28]。气相色谱法〔气相色谱-

氢火焰离子化检测器法(GC-FID)和气相色谱-电子轰击离子源-质谱法(GC-EI-MS)]使酚类物质的分离与鉴定得以改善。但是,为了解决大多数挥发性酚类物质难以检测的问题,样品需要衍生化,而高温会导致酚类物质部分热降解。气相色谱技术的不足,推动了 HPLC 的开发应用。最先用于分离生物酚的是正相 HPLC^[11],后来发现反相 HPLC 对大多数酚类极性化合物的分离度和重现性更佳。当前,HPLC 成为酚类物质分析的主流技术,固相萃取-高效液相色谱-二极管阵列检测器(SPE-HPLC-DAD)与液液萃取-高效液相色谱-紫外检测器(LLE-HPLC-UV)是测定酚类的 IOC 官方方法反相高效液相色谱-紫外/二极管阵列检测器(RP-HPLC-UV/PDA)定量羟基酚醇和酚醇的 ISO 标准都采用 HPLC。因此,酚类物质,特别是裂环烯醚萜类化合物的色谱基线分离成为准确定量的基础。

橄榄油中裂环烯醚萜类衍生物(90% 为橄榄苦苷和女贞苷)因水解和酮-烯醇异构化,产生许多微量异构体,导致其基线难以分离。如在 IOC 2022 版 COL/T.20/Doc No 29/Rev.2 标准方法 1 的 LLE-HPLC-UV 方法中,在色谱峰 11 后有基线严重未分离的 4 个峰族,如图 2 所示。

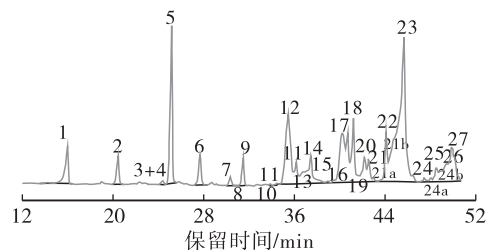


图 2 特级初榨橄榄油中生物酚在 280 nm 处 HPLC-UV 图

COL/T.20/Doc No 29/Rev.2 标准方法 2 的 SPE-HPLC-DAD 方法中,分离的酚类色谱峰总数从 2017 版的 27 个降至 2022 版的 17 个,裂环烯醚萜聚集成 5 个基线分离,显著改善的色谱峰如图 3 所示。

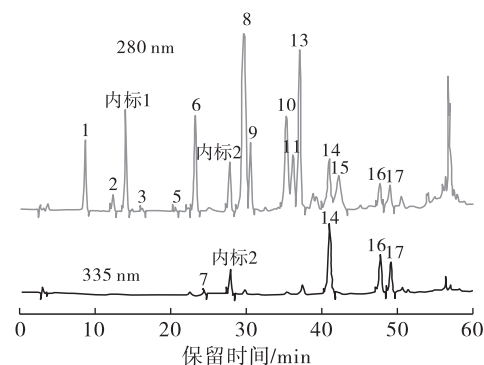


图 3 SPE-二醇柱分离橄榄油酚类物质的 HPLC-DAD 图

如图3所示,色谱基线改善的5个色谱峰为峰8(二醛式脱羧甲基苦苣昔元),峰9(醛式苦苣昔元衍生物),峰10(二醛式脱羧甲基女贞昔元),峰15(醛式苦苣昔元),峰17(醛式女贞昔元)。显然,色谱基线改善的5个色谱峰中每个峰包含的化合物数量增加,是色谱分离度降低、结构性质相似的酚类单体化合物合并色谱峰的结果,距离单体化合物分离定量的目标更远。对于橄榄油中复杂的裂环烯醚萜单体化合物的色谱基线分离,至今仍是一道难以逾越的坎。如果不能充分地色谱分离,即使采用最精确的质量分析器也无法实现异构体的分离。

3.3 标准品缺失

大多数酚类单体化合物测定的主要问题之一是缺乏纯标准品,酚类单体化合物通常采用具有不同响应因子的特定标准品定性、定量,这取决于其分子结构和所使用的检测器^[29]。橄榄油酚类物质中,酚酸的标准品相对较多、色谱峰分离最好,易准确定量;而裂环烯醚萜衍生物的标准品到目前为止实现商业化的仍然十分有限,报道最多的单体酚类物质有酪醇、羟基酪醇、榄香醇酸、刺激醛、油精、橄榄苦苣昔元、女贞昔元。

在无法获得商业化的标准品时,经常基于分子结构和使用的检测器选用已有的参考物质,采取不同响应因子来应对。例如,西班牙 Eduardo (2021年)利用大学合成的一些标准品定量了30种橄榄苦苣昔元和女贞昔元衍生物^[30]。这种使用相似化合物作标准品定量,是基于假定响应因子相当,实际上响应偏差带来的计量误差在所难免。事实上,

即使是非常精细的特异性分离技术,在缺乏标准品的情况下,也会导致定量测定的极大的不准确^[31]。

IOC官方标准(COL/T.20/Doc No 29/Rev.2)方法1中,使用丁香酸和酪醇作内标,设定通用响应因子 $[RRF_{\text{tyr/tyr}}(5.1 \pm 0.4)]$ 折算成橄榄油酚类物质含量(以酪醇含量计)。方法2中,仅使用内标1对羟苯乙酸(在280 nm定量非阿魏酸的酚酸和裂环烯醚萜)和内标2邻香豆酸(在335 nm定量阿魏酸、毛地黄黄酮、芹黄素),并“精确”折算出全部17个色谱峰的独立响应因子。这些采用近似响应因子定量策略,都是在无法获得目标化合物标准品的情况下采取的权宜之计。该官方方法远不足以准确测定橄榄油生物酚的组成。

总之,生物酚的商业化标准品缺乏,是准确定量的核心难点。这也是用同位素标记或高纯度参考物质开展酚类单体化合物精确定量的文献少见的主要原因。用相似化合物作参考物质,或者用一种标准品定量多种单体化合物的策略十分常见。当然,标准品越多则结果越准确。

3.4 单体酚法与总酚法的不兼容性

对于初榨橄榄油酚类物质的定量,经典的福林比色法仍然广泛用于酚类物质粗定量,也发展了一系列基于分光光度法、光谱法、比色法、酶法、核磁共振法、电化学法和色谱技术的分析方法,这些测定酚类物质含量的方法可划分为两大类,即定量酚类单体化合物的特异性方法(单体酚法)与定量总酚含量的非特异性方法(总酚法),其测定方法实例如表2所示^[32]。

表2 初榨橄榄油生物酚测定方法实例

样品处理	分析工具	分析物质	定量标准物质	结果表达	缺点
超声提取	LC-DAD (82 min)	整体结果(酚酸、简单酚类、裂环烯醚萜、类黄酮、木酚素)	丁香酸(内标)/酪醇	以酪醇含量计	时间长,认为所有物质响应因子相同
液液萃取+酸水解(2 h)	LC-DAD (50 min)	2种分析物(简单酚类和间接测定裂环烯醚萜)	2种标准物质(酪醇和羟基酪醇)	以酪醇和羟基酪醇含量计	样品制备要分2个步骤,涉及对目标化合物的化学修饰,没有测定一些相关的酚族化合物
水解(6 h)	LC-DAD (70 min)	2种分析物(简单酚类和间接测定裂环烯醚萜)	2种标准物质(酪醇和羟基酪醇)	以酪醇和羟基酪醇含量计	涉及对目标化合物的化学修饰,没有测定一些相关的酚族化合物
超声+水解(1 h)+衍生(1 h)	GC-FID (42 min)	2种分析物(简单酚类和间接测定裂环烯醚萜)	2种标准物质(酪醇和羟基酪醇)	以酪醇和羟基酪醇含量计	样品制备要分3个步骤,涉及对目标化合物的化学修饰,没有测定一些相关的酚族化合物

续表 2

样品处理	分析工具	分析物质	定量标准物质	结果表达	缺点
固相萃取(SPE)	CZE - DAD (7 min)	13 个分析物(酚酸、简单酚类、裂环烯醚萜、类黄酮、木酚素)	8 种标准物质	以分析物含量计	一些峰会同时洗脱,用不同的标准品对 5 种成分进行定量
液液萃取 + 衍生 (30 min)	GC - EI - (IT) MS (55 min)	27 个分析物(酚酸、简单酚类、裂环烯醚萜)	芥子酸(内标)	以分析物含量计	认为所有分析物的响应因子相同,不考虑类黄酮和木酚素类
直接进样	LC - DAD/ FLD(73 min)	7 个分析物(简单酚类、裂环烯醚萜、木酚素)	2 种标准物质和 5 个分离的化合物	以分析物含量计	测定的分析物数量稀少,没有考虑类黄酮
液液萃取	LC - ESI - (IT) MS (25 min)	20 个分析物(酚酸、简单酚类、裂环烯醚萜、类黄酮、木酚素)	10 种标准物质	以分析物含量计	用不同的标准品对 10 种成分进行定量
液液萃取	¹ H NMR	4 个分析物(裂环烯醚萜)	4 个分离的化合物	以分析物含量计	测定的分析物数量稀少,只考虑了主要的裂环烯醚萜

注:CZE. 毛细管区带电泳;FLD. 荧光检测器

测定酚类化合物含量时,特异性的单体酚法与非特异性的总酚法在多数情况下,都先使用甲醇溶液经 LLE 或 SPE 充分提取橄榄油中的酚类物质。单体酚法不需水解,采用尽可能多的标准品,对色谱分离的酚类单体化合物分别定量加和。如前所述,由于永远不能得到齐全的标准品,无法解决响应因子问题,定量偏差不可避免。

总酚法则需对橄榄油酚类提取物进行水解,释放出裂环烯醚萜的共性母核酪醇或羟基酪醇,经色谱分离后,再用紫外光或可见光分光光度计比色测定总酚含量,通常使用 1~2 个标准品,假定响应因子一致,将总酚含量折算成酪醇或酪醇 + 羟基酪醇含量。显然,测定水解后产生的羟基酪醇 + 酪醇可同时定量裂环烯醚萜衍生物,但是,检测结果不能包含橄榄油中非羟基酪醇衍生物结构的类黄酮与木酚素等酚类物质。并且,不同裂环烯醚萜对应的分子质量不同,需要用不同的校正因子也是个问题。此外,水解法适用性已验证初榨橄榄油中羟基酪醇 + 酪醇的含量范围为 100~400 mg/kg^[33],并未验证含有更丰富酚类初榨橄榄油水解反应的有效性。核磁共振氢谱法主要用于裂环烯醚萜类化合物的测定,很难用于高度异质化生物酚的同时定量。

研究表明,总酚法与单体酚法对橄榄油酚类物质含量的测定结果很不一致。西班牙 Lucía (2019 年)首次将一种特异性单体酚法(LC-MS)与 3 种非特异性总酚法(福林比色法、IOC 方法、水解 +

HPLC-DAD 法)进行了系统的比较,发现特异性单体酚法的总酚含量测定值比 3 种非特异性方法的高 2~3 倍。虽然 IOC 方法、水解 + HPLC-DAD 法(酪醇 + 羟基酪醇)、福林比色法(酪醇 + 羟基酪醇、咖啡酸)3 种总酚法相关性高($R^2 = 0.9$),具有可比性,但是总酚含量结果都系统性偏低^[32]。总之,总酚法的测定结果与单体酚法的结果从数学和化学的角度都不具可比性。橄榄油中生物酚的准确定量是一个复杂过程,不同技术的局限性以及结果表达的标准不统一,造成了在应用中的混乱,因此橄榄油中生物酚的准确定量之路漫长。

4 突破瓶颈的技术发展方向

4.1 直接进样法实现全回收率与零人工产物

与传统的 LLE 和 SPE 提取方式相比,直接进样法的主要优势是无需提取即可回收所有酚类物质,避免假象人工异构体产物的干扰,并消除了部分氧化的生物酚。已有案例验证这种方法定量可靠有前景^[17]。丰益(上海)生物技术研发中心有限公司采用的 Waters AQUITY UPC2 超高效合相色谱仪具有比 HPLC 中流动相扩散率更高、比 GC 更低温度下分离的优势,橄榄油样品无需衍生化,含有全部游离脂肪酸的有机相提取物可以直接注入系统,实现了超临界流体色谱(SFC)从未达到的潜能极限,橄榄油生物酚的单体化合物色谱分离度显著改善。橄榄油酚类物质的超高效合相色谱图如图 4 所示。

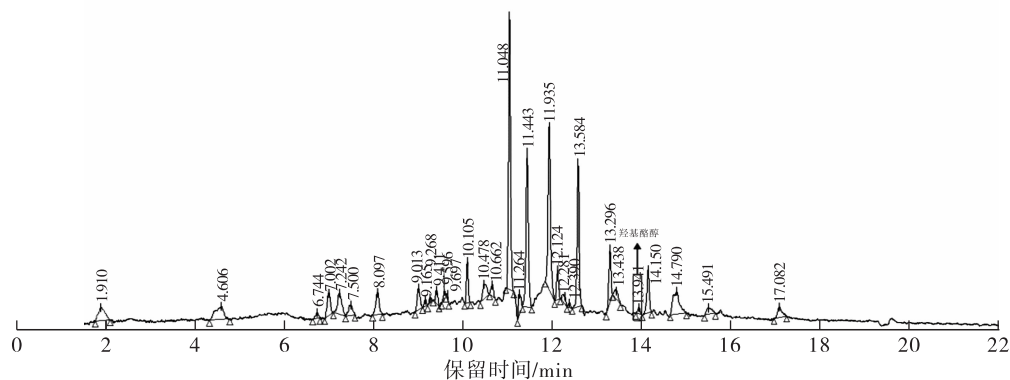


图4 橄榄油酚类物质的超高效合相色谱图

4.2 高选择性的离子淌度质谱(IM-MS)提升分辨力与准确性

基于质谱内在的高选择性可获得更高的定量准确性。离子淌度具有分离不同尺寸、形状、电荷状态离子的独特能力,并可测定其横截面,是一种正交分离方法,可对色谱和电泳等经典分离方法进行补充。已经有报道采用脱溶低流量二次电喷雾电离(D-LFSESI)、微分迁移率分析(DMA)与质谱结合分析橄榄油中生物酚的新方法^[34]。因此,基于生物酚异构体不同的空间位阻,用离子淌度质谱与液相色谱技术的联用可能会非常有效,利于灵敏度和准确性的提升。

4.3 二维液相色谱(LC×LC)与高灵敏检测器降基质效应与增灵敏度

由于基质的复杂性,一维液相色谱往往不足以获得足够的分离度。基质效应对生物酚回收率的影响在3%~13%^[35],仍有优化空间。有更高的分辨率、更小的共洗脱的二维液相可显著降低多数橄榄油酚类物质在检测器的基质干扰^[35]。同时,高灵敏的电子捕获检测器(ECD)等配套使用,也将大幅提升灵敏度。使用ECD与不同波长UV检测器的22种酚类物质混标的液相色谱图见图5^[36]。

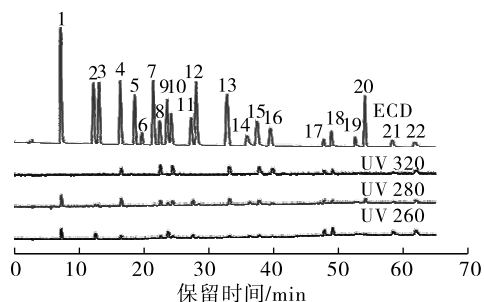


图5 使用ECD与不同波长UV检测器的22种酚类物质混标的液相色谱图

4.4 加速裂环烯醚萜类标准品研制

鉴于当前商业化裂环烯醚萜类标准品仍十分稀

缺,深入开展裂环烯醚萜的化学结构与性质的研究,通过纯化分离制备高纯度的裂环烯醚萜类化合物,加速研制标准品将是一个长期策略。

5 结束语

科学界一直在努力寻找最科学的橄榄油酚类物质的分析方法,但迄今为止,不同的观点和选择方法并存,尚未达成一致认可的方法。理论上使用所研究的所有酚类物质的纯标准品,以LC-MS单独测定单体化合物的绝对浓度的方法是最准确的,但目前还无法实现。当不需要分析全部酚类的单体化合物组成时,非特异性的总酚法是一个便捷的选择,但因为基线分离的不可行,无法实现准确定量。突破准确定量的瓶颈,短期内无法实现,尽管如此,学术界仍然可以从标准品研制、前处理减少酚类损失与避免新增人工产物、检测仪器的高选择性与高灵敏度、测试过程的去基质效应以及避免假象人工产物干扰等方面进行努力,逐步完善准确定量橄榄油中生物酚的方法,支撑EFSA橄榄油生物酚健康声称,以及高品质橄榄油的准确评价。

参考文献:

- [1] APARICIO R, HARWOOD J. Handbook of olive oil: Analysis and properties [M]. Boston, MA: Springer, 2013.
- [2] BOSKOU D. Olive oil: Chemistry and technology [M]. 2nd ed. Champaign, Ill.: AOCS Press, 2006.
- [3] CIRIMINNA R, MENEGUZZO F, FIDALGO A, et al. Extraction, benefits and valorization of olive polyphenols [J]. Eur J Lipid Sci Tech, 2016, 118(4): 503-511.
- [4] 吕孝飞, 马君义, 郭俊炜, 等. 成熟度指数对不同品种橄榄油脂肪酸、酚类化合物及风味属性的影响[J]. 中国油脂, 2022, 47(1): 28-35.
- [5] NIKOU T, WITT M, STATHOPOULOS P, et al. Olive oil quality and authenticity assessment aspects employing FIA-MRMS and LC-orbitrap MS metabolomic approaches [J/OL]. Front Public Health, 2020, 8:

- 558226 [2023 - 02 - 25]. <https://doi.org/10.3389/fpubh.2020.558226>.
- [6] European Commission. Commission Regulation (EU) No 432/2012 of 16 May 2012 establishing a list of permitted health claims made on foods, other than those referring to the reduction of disease risk and to children's development and health [J]. *Off J Eur Union*, 2012, 136: 1 - 40.
- [7] SIANO F, VASCA E, PICARIELLO G. Accurate determination of total biophenols in unfractionated extra - virgin olive oil with the fast blue BB assay [J/OL]. *Food Chem*, 2022, 370: 130990 [2023 - 02 - 25]. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.130990>.
- [8] OUNI Y, TAAMALLI A, GÓMEZ - CARAVACA A M, et al. Characterisation and quantification of phenolic compounds of extra - virgin olive oils according to their geographical origin by a rapid and resolute LC - ESI - TOF MS method [J]. *Food Chem*, 2011, 127(3): 1263 - 1267.
- [9] SERRELI G, DEIANA M. Biological relevance of extra virgin olive oil polyphenols metabolites [J/OL]. *Antioxidants*, 2018, 7(12): 170 [2023 - 02 - 05]. <https://doi.org/10.3390/antiox7120170>.
- [10] PEDAN V, POPP M, ROHN S, et al. Characterization of phenolic compounds and their contribution to sensory properties of olive oil [J/OL]. *Molecules*, 2019, 24(11): 2041 [2023 - 02 - 05]. <https://doi.org/10.3390/molecules24112041>.
- [11] BONGIORNO D, STEFANO V D, INDELICATO S, et al. Bio - phenols determination in olive oils; Recent mass spectrometry approaches [J]. *Mass Spectrom Rev*, 2023, 42(4): 1462 - 1502.
- [12] DE LEONARDIS A, ANGELICO R, MACCIOLA V, et al. Effects of polyphenol enzymatic - oxidation on the oxidative stability of virgin olive oil [J]. *Food Res Int*, 2013, 54(2): 2001 - 2007.
- [13] HASLAM E. *Plant polyphenols: Vegetable tannins revisited* [M]. Cambridge: Cambridge University Press, 1989.
- [14] OBIED H K. Biography of biophenols: Past, present and future [J/OL]. *Funct Foods Health Dis*, 2013, 3(6): 230 [2023 - 02 - 25]. <https://doi.org/10.31989/ffhd.v3i6.51>.
- [15] FU S, ARRÁEZ - ROMÁN D, MENÉNDEZ J A, et al. Characterization of isomers of oleuropein aglycon in olive oils by rapid - resolution liquid chromatography coupled to electrospray time - of - flight and ion trap tandem mass spectrometry [J]. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 2009, 23(1): 51 - 59.
- [16] EFSA Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies (NDA), European Food Safety Authority (EFSA). Scientific Opinion on the substantiation of health claims related to polyphenols in olive and protection of LDL particles from oxidative damage (ID 1333, 1638, 1639, 1696, 2865), maintenance of normal blood HDL - cholesterol concentrations (ID 1639), maintenance of normal blood pressure (ID 3781), "anti - inflammatory properties" (ID 1882), "contributes to the upper respiratory tract health" (ID 3468), and "can help to maintain a normal function of gastrointestinal tract" (3779), and "contributes to body defences against external agents" (ID 3467) pursuant to Article 13(1) of Regulation (EC) No 1924/2006 [J/OL]. *EFSA J*, 2011, 9(4): 2033 [2023 - 02 - 25]. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2011.2033>.
- [17] DINDA B, DEBNATH S, BANIK R. Naturally occurring iridoids and secoiridoids. An updated review, part 4 [J]. *Chem Pharm Bull*, 2011, 59(7): 803 - 833.
- [18] MASTRALEXI A, NENADIS N, TSIMIDOU M Z. Addressing analytical requirements to support health claims on "olive oil polyphenols" (EC regulation 432/2012) [J]. *J Agric Food Chem*, 2014, 62(12): 2459 - 2461.
- [19] International Olive Council. Document to declare the use of ioc methods for phenolic compounds determination; COI/T.20/Doc No 29/Rev. 2 [S/OL]. [2023 - 02 - 05]. <http://www.internationaloliveoil.org/wp-content/uploads/2022/06/DEC-2-115-PHENOLTC-COMPOUNDS-ENK.pdf>.
- [20] International Olive Council. Determination of Biophenols in olive oils by HPLC; COI/T.20/Doc No 29/Rev. 1 [S/OL]. [2023 - 02 - 25]. <https://www.internationaloliveoil.org/wp-content/uploads/2022/06/Doc.-No-29-REV-2-ENK.pdf>.
- [21] FINICELLI M, SQUILLARO T, GALDERISI U, et al. Polyphenols, the healthy brand of olive oil: Insights and perspectives [J/OL]. *Nutrients*, 2021, 13(11): 3831 [2023 - 02 - 25]. <https://doi.org/10.3390/nu13113831>.
- [22] MATEOS R, ESPARTERO J L, TRUJILLO M, et al. Determination of phenols, flavones, and lignans in virgin olive oils by solid - phase extraction and high - performance liquid chromatography with diode array ultraviolet detection [J]. *J Agric Food Chem*, 2001, 49(5): 2185 - 2192.
- [23] SÁNCHEZ DE MEDINA V, MIHO H, MELLIOU E, et al. Quantitative method for determination of oleocanthal and oleacein in virgin olive oils by liquid chromatography - tandem mass spectrometry [J]. *Talanta*, 2017, 162: 24 - 31.
- [24] CELANO R, PICCINELLI A L, PUGLIESE A, et al. Insights into the analysis of phenolic secoiridoids in extra

- virgin olive oil[J]. *J Agric Food Chem*, 2018, 66(24): 6053 – 6063.
- [25] VELÁZQUEZ – PALMERO D, ROMERO – SEGURA C, GARCÍA – RODRÍGUEZ R, et al. An oleuropein β – glucosidase from olive fruit is involved in determining the phenolic composition of virgin olive oil [J/OL]. *Front Plant Sci*, 2017, 8: 1902[2023 – 02 – 25]. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01902>.
- [26] LIMIROLI R, CONSONNI R, OTTOLINA G, et al. ¹H and ¹³C NMR characterization of new oleuropein aglycones [J/OL]. *J Chem Soc, Perkin Trans 1*, 1995(12): 1519 [2023 – 02 – 25]. <https://doi.org/10.1039/p19950001519>.
- [27] KARKOULA E, SKANTZARI A, MELLIYOU E, et al. Quantitative measurement of major secoiridoid derivatives in olive oil using qNMR. Proof of the artificial formation of aldehydic oleuropein and ligstroside aglycon isomers [J]. *J Agric Food Chem*, 2014, 62(3): 600 – 607.
- [28] RAGAZZI E, VERONESE G. Quantitative analysis of phenolic compounds after thin – layer chromatographic separation [J]. *J Chromatogr A*, 1973, 77(2): 369 – 375.
- [29] PIRISI F M, CABRAS P, CAO C F, et al. Phenolic compounds in virgin olive oil. 2. Reappraisal of the extraction, HPLC separation, and quantification procedures [J]. *J Agric Food Chem*, 2000, 48(4): 1191 – 1196.
- [30] LÓPEZ – HUERTAS E, LOZANO – SÁNCHEZ J, SEGURA – CARRETERO A. Olive oil varieties and ripening stages containing the antioxidants hydroxytyrosol and derivatives in compliance with EFSA health claim [J/OL]. *Food Chem*, 2021, 342: 128291[2023 – 02 – 25]. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.128291>.
- [31] OLMO – GARCÍA L, POLARI J J, LI X, et al. Deep insight into the minor fraction of virgin olive oil by using LC – MS and GC – MS multi – class methodologies [J]. *Food Chem*, 2018, 261: 184 – 193.
- [32] OLMO – GARCÍA L, FERNÁNDEZ – FERNÁNDEZ C, HIDALGO A, et al. Evaluating the reliability of specific and global methods to assess the phenolic content of virgin olive oil: Do they drive to equivalent results? [J]. *J Chromatogr A*, 2019, 1585: 56 – 69.
- [33] ROMERO C, BRENES M. Analysis of total contents of hydroxytyrosol and tyrosol in olive oils [J]. *J Agric Food Chem*, 2012, 60(36): 9017 – 9022.
- [34] PIÑERO M Y, AMO – GONZÁLEZ M, BALLESTEROS R D, et al. Chemical fingerprinting of olive oils by electrospray ionization – differential mobility analysis – mass spectrometry: A new alternative to food authenticity testing [J]. *J Am Soc Mass Spectrom*, 2020, 31(3): 527 – 537.
- [35] ARENA K, CACCIOLA F, RIGANO F, et al. Evaluation of matrix effect in one – dimensional and comprehensive two – dimensional liquid chromatography for the determination of the phenolic fraction in extra virgin olive oils[J]. *J Sep Sci*, 2020, 43(9/10): 1781 – 1789.
- [36] ZHU Z, LI X, ZHANG Y, et al. Profiling of phenolic compounds in domestic and imported extra virgin olive oils in China by high performance liquid chromatography – electrochemical detection [J/OL]. *LWT – Food Sci Technol*, 2023, 174: 114424[2023 – 02 – 25]. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2023.114424>.

(上接第 127 页)

2.3 整体质量和使用寿命得到保证

烘干机轻量化设计,零部件均采用板材加工成型,较国内现有烘干机节省材料 15% 以上,由于零部件通用化程度高,加工和建设时间缩短 30% 以上。全镀锌材料的加工和应用,使烘干机适用范围更广、使用寿命更长,整体使用寿命可达 20 年。

3 结束语

“十四五”期间,随着加快粮油产地烘干能力建设工作的深入实施,发展节能高效绿色技术与装备,推广应用节能、高效、低碳烘干设施装备,成为保障粮油品质、减少产后灾后损失、确保粮油丰收到手的重要环节和关键措施。新型粮油烘干机已在农业产后领域、深加工企业和种子行业得到初步应用,经实际运行和性能测试,在提升物料烘后品质、减少产后损失、设备节能降耗减排、清洁生产方面效果显著,

符合我国现代农业高质量发展需求。

参考文献:

- [1] 中共中央、国务院关于深入推进农业供给侧结构性改革加快培育农业农村发展新动能的若干意见[EB/OL]. (2017 – 02 – 06) [2023 – 10 – 10]. http://www.moa.gov.cn/ztl/yhwj2017/zywj/201702/t20170206_5468567.htm.
- [2] 任广跃,张伟,陈曦,等. 缓苏在粮食干燥中的研究进展[J]. *食品科学*, 2016, 37(1): 279 – 285.
- [3] 赵思孟. 粮食干燥技术[M]. 郑州:河南科学技术出版社, 1991.
- [4] 刘磊,杨迎亚,张泽禹. 防自动分级装置在粮食筒仓中的应用[J]. *现代食品*, 2018(10): 68 – 69, 72.
- [5] 邸坤,李云克,闫汉书,等. 我国高水分稻谷干燥工艺设备的研究设计及应用[J]. *粮食与饲料工业*, 2012(3): 16 – 20.
- [6] 潘永康. 现代干燥技术[M]. 北京:化学工业出版社, 1998.