



初榨橄榄油中叶绿素降解产物脱镁叶绿素和原焦脱镁叶绿素的 HPLC 荧光检测分析

应用简报

作者

Xueqi Li, Selina Wang
加利福尼亚大学戴维斯分校橄榄中心
罗伯特·蒙大维葡萄酒与食品科学研究所
Davis, CA 95616

Michael Woodman
安捷伦科技有限公司
Suite 550, 10 N. Martingale Road
伊利诺伊州绍姆堡 60173

摘要

本应用简报介绍了一种简便而快速的方法，其采用经改良的光电倍增管 (PMT) 的荧光检测器 (FLD) 来分析特级初榨橄榄油 (EVOO) 中叶绿素热降解产物脱镁叶绿素 (PP) 和原焦脱镁叶绿素 (PPP)。采用 Hamamatsu R928HA 红敏 PMT 代替标准 PMT，可以将原始信号提高约 120 倍。另外，由于基线噪音的降低，总体分析性能提高了 180 倍。本方法对稀释的 EVOO 直接进行分析，无需进行其他的样品前处理，与传统国际标准组织 (ISO) 的固相萃取 (SPE)/紫外检测 (UV) 方法相比，该方法不仅降低溶剂消耗量和缩短液相色谱循环时间，分离度也得到了提高。



Agilent Technologies

前言

EVOO 是采用机械方法从橄榄 (*Olea europaea* L.) 中获得的。叶绿素是存在于 EVOO 中的天然绿色色素, 已证明其在加工和储存过程中易于降解为脱镁叶绿素和原焦脱镁叶绿素。在果实研磨和打浆过程中, 叶绿素受酸性条件和加热的影响尤为明显, 各成分的密切接触, 往往会释放出酸性化合物, 导致大幅度的叶绿素脱镁反应 [1]。因此可使用叶绿素降解产物作为 EVOO 的一个质量参数。ISO 的 PPP 分析方法作为橄榄油标准的一部分, 于 2010 年被澳大利亚和新西兰采用, 而其他国家尚待采用。根据所获得的数值可确定 EVOO 的保存是否得当, 或者 EVOO 是否掺杂了精炼橄榄油。

ISO 29841 中的传统 SPE/UV 方法包括几个样品前处理步骤, 这些步骤会耗费大量的溶剂和时间。在改良的 FLD 方法中, 采用异丙醇稀释橄榄油样品后即可进行 HPLC 进样分析。采用四元溶剂梯度方法, 通过四元梯度泵进行第四种强溶剂 (四氢呋喃) 冲洗, 不需要对任何溶剂进行预混合, 而且还大大减少了前次分析在色谱柱上残留的橄榄油。此外, 采用在红光区更敏感的 PMT 代替标准 PMT, 使 FLD 灵敏度提高了 180 倍。

实验部分

仪器配置

ISO 29841 SPE/UV 方法

Agilent 1290 Infinity 二元液相色谱系统, 由化学工作站 (版本 C.01.03 [44]) 控制, 含以下模块: 二极管阵列检测器 (DAD) 作为原始 ISO 方法的 UV 检测器。

- Agilent 1290 Infinity 二元泵 (G4220A)
- Agilent 1290 Infinity 自动进样器 (G4226A)
- Agilent 1290 Infinity 柱温箱 (G1316C)
- Agilent 1290 Infinity 二极管阵列检测器 (G4212A)

改良的 FLD 方法

Agilent 1260 Infinity 四元液相色谱系统, 由化学工作站 (版本 C.01.03 [44]) 控制, 含以下模块:

- Agilent 1260 Infinity 四元泵 (G4204A)
- Agilent 1290 Infinity 自动进样器 (G4226A)
- Agilent 1290 Infinity 柱温箱 (G1316C)
- Agilent 1260 Infinity 荧光检测器 (G1321B), 配置 Hamamatsu R928HA PMT

样品前处理

所有溶剂均为液相色谱级 (与液相色谱条件中相同)。新制 Milli-Q 水来自配置 0.22 μm 膜式终端过滤器 (Millipak) 的 Milli-Q Integral 水纯化系统。

ISO SPE/UV 方法

将约 300 mg 橄榄油样品溶解在 1 mL 石油醚中, 充分涡旋混合。将样品溶液注入 1000 mg/6 mL 硅胶小柱 (Phenomenex, 美国加利福尼亚州托伦斯) 上, 用每份 1 mL 的石油醚淋洗两次。一旦溶剂在柱填料顶部排干, 用 5 mL 的石油醚/乙醚 (90:10, v/v) 洗脱非极性物质两次, 并弃去。然后, 用 5 mL 丙酮洗脱脱氧叶绿素组分, 将其收集到一支 10 mL 玻璃试管中, 用锡箔盖封 (避光)。用旋转蒸发器在最高 20 $^{\circ}\text{C}$ 下蒸干溶剂, 再用 1 mL 丙酮复溶, 以进行下一步 HPLC 分析 [2]。

改良的 FLD 方法

取 200 mg 的橄榄油样品溶解在 1 mL 异丙醇溶剂中, 涡旋混合 15 秒。

液相色谱条件

ISO SPE/UV 方法

ISO 29841 SPE/UV 方法的液相色谱条件列于表 1。本实验中由 3.0×100 mm C18 柱代替了原方法的 4.6×250 mm C18 柱。使用等梯度洗脱方法。

表 1. ISO SPE/UV 方法的色谱条件

固定相	Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18 色谱柱, 3.0 × 100 mm, 1.8 μm
洗脱流动相	水/甲醇/丙酮 (4:36:60, v/v/v)
流速	0.5 mL/min
进样量	5 μL
检测器	二极管阵列检测器, 410 nm

改良的 FLD 方法

液相色谱系统采用表 2 中的色谱条件对样品进行分析, 四元溶剂梯度如表 3 所示。

表 2. 改良的 FLD 方法的色谱条件

固定相	Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18 色谱柱, 3.0 × 100 mm, 1.8 μm
流动相	梯度见表 3
进样量	5 μL
检测器	红光敏感型 FLD, 激发波长 430 nm/发射波长 670 nm

表 3. 改良的 FLD 方法的四元溶剂梯度

时间 (min)	A 水 %	B 四氢呋喃 %	C 甲醇 %	D 丙酮 %	流速 (mL/min)
0	4	0	76	20	0.5
4	4	0	36	60	0.5
14	4	0	36	60	0.5
14.2	0	100	0	0	1.0
20.9	0	100	0	0	1.0
21	4	0	76	20	0.5
25	分析结束, 准备进样新的样品				

结果与讨论

图 1 显示了两种 ISO 样品前处理和检测方案得到的叠加色谱图, 这两种样品前处理和检测图解分别为 SPE/UV (蓝色) 和稀释/FLD (红色), 并使用针对稀释/FLD 新开发的改良色谱条件。两种方法得到的 PPP 值均为 15% (根据公式 1 计算)。两种样品前处理方法都显示出了良好的 HPLC 分离度, 脱氧叶绿素 a 和脱氧叶绿素 a' 的分离度比指定的 ISO 法色谱条件有了明显改善。

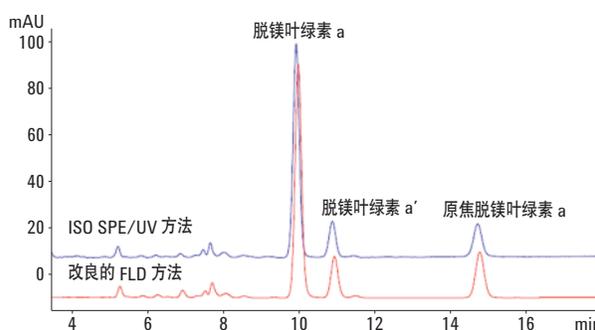


图 1. 采用两种样品制备方法 (SPE 和简单稀释法) 获含 15% 叶绿素 a 降解产物 PPP 的特级初榨橄榄油的叠加色谱图。条件与改良荧光方法所用的条件相同

ISO SPE/UV 方法的样品前处理时间为 30 分钟, HPLC 分析时间为 40 分钟或更长。而采用改良后的 UHPLC/FLD 方法, 配置 3.0×100 mm C18 柱的四元系统, 稀释步骤非常短暂, 分析时间缩短到 25 分钟。与标准 ISO 条件相比, UHPLC 分析的溶剂消耗量和总分析时间只有原来的 40% 或更少。这表明分析成本和时间显著减少, 而且还提高了低含量样品的灵敏度。

$$\% \text{ PPP} = 100 \times \text{Appp} / (\text{App} + \text{Appp})$$

其中,

% PPP = % 橄榄油样品中原焦脱镁叶绿素的 % 含量

Appp = 原焦脱镁叶绿素 a 的峰面积

App = 脱镁叶绿素 a 和脱镁叶绿素 a' 的总峰面积

公式 1. 橄榄油中 PPP 含量的计算

如果待测 EVOO 样品中 PPP 的含量较低，通过紫外检测不能进行充分定量，如图 2 所示。在两种条件下分析最近收获的 EVOO 样品。采用 ISO SPE/UV 方法得到的 PPP 值为 0，这在理论上是不准确的，因为一旦橄榄加工成油，就会出现脱甲酯基化，使脱镁叶绿素转化为原焦脱镁叶绿素。而采用改良的 FLD 方法，仍然可检测到少量的 PPP (6%)。

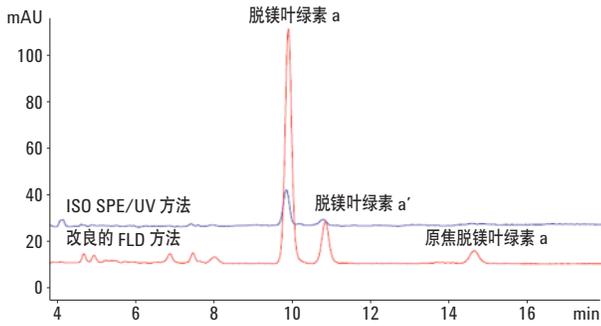


图 2. 采用两种方法获得的含 6% 叶绿素 a 降解产物 PPP 的 EVOO 叠加色谱图

表 3 进一步证实了改良的 FLD 方法的高选择性和灵敏度。我们用两种方法对特级淡味橄榄油进行了分析。特级淡味橄榄油主要由精炼橄榄油和初榨橄榄油勾兑而成。因此，其 PPP 的含量相当低。如图 3 所示，DAD 方法的响应信号极低，而背景噪音很高。因而妨碍了对这种特级淡味橄榄油中的 EVOO 部分进行 PPP 含量测定。反之，采用改良的 FLD 方法，低至 0.15 LU 的信号也可以检测到，并且还能根据峰面积进一步测定 PPP 的含量。

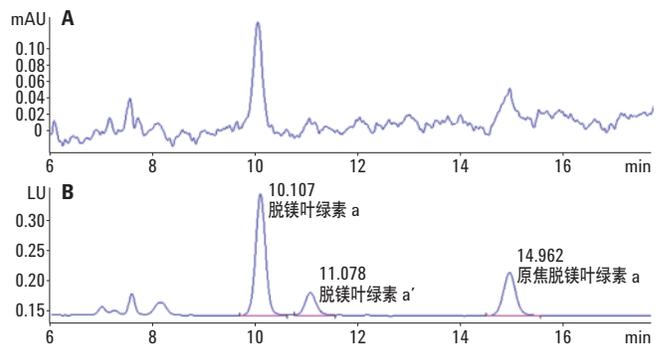


图 3. 采用两种方法 (ISO SPE/UV 方法 (A) 和改良的 FLD 方法 (B)) 分离同一特级淡味橄榄油样品中的叶绿素 a 降解产物

使用两种不同的 PMT 以及特定梯度和色谱柱重复进行分析，所得结果见表 4。采用 Hamamatsu R928HA 使原始信号提高了约 120 倍。由于降低了基线噪音，信号进一步得到了改善，总体增加了 180 倍。

表 4. 列出了将光电倍增管更换为推荐的安捷伦替代品后所获得的改善结果

脱镁叶绿素 a、a' 和原焦脱镁叶绿素的检测
改良的 FLD (激发波长 430 nm/发射波长 670 nm) 的分析结果总结

PMT	标准配置	R928HA
总峰面积*	6.8	854.5
平均信噪比	34.8	6847.5

* 脱镁叶绿素 a、脱镁叶绿素 a' 和原焦脱镁叶绿素响应总和

结论

实验证明，与传统的 ISO SPE/UV 方法相比，改良的 FLD 方法是一种更有前景的选择。在本实验中，用 R928HA 红敏光电倍增管取代标准 PMT 后，可以检测低含量的 PPP 样品。从而在时间、人力、SPE 材料和溶剂消耗量等方面，为那些极多样品分析的实验室节省了大量的成本。

参考文献

1. D. Hornero-Méndez, B. Gandul-Rojas, and M.I. Mínguez-Mosquera "Routine and sensitive SPE-HPLC method for quantitative determination of pheophytin a and pyropheophytin a in olive oils" *Food Research International* **38**, 1067-1072, doi:10.1016/j.foodres.2005.02.022 (2005)
2. Vegetable fats and oils - Determination of the degradation products of chlorophylls a and a' (pheophytins a, a', and pyropheophytins), ISO 29841:2009

更多信息

这些数据仅代表典型的结果。有关我们的产品与服务的详细信息，请访问我们的网站 www.agilent.com/chem/cn

www.agilent.com/chem/cn

安捷伦不对本文可能存在的错误或由于提供、展示或使用本文所造成的间接损失承担任何责任。

本资料中的信息、说明和指标如有变更，恕不另行通知。

© 安捷伦科技（中国）有限公司，2014
2014年4月10日，中国印刷
5991-4384CHCN

