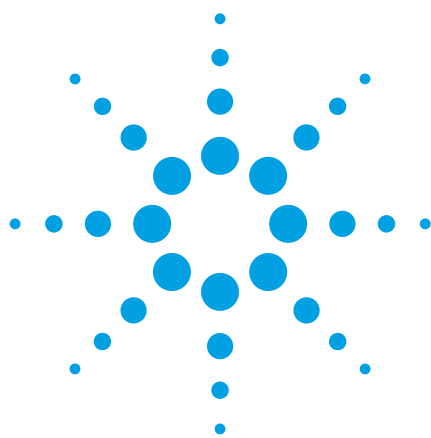




应用 Agilent Poroshell 120 SB-C18 色谱柱分析常见食品中的花青素

应用报告

食品 / 医药

作者

William J. Long
安捷伦科技公司
2850 Centerville Road
Wilmington, DE 19808
美国

摘要

将最初使用 Agilent StableBond SB-C18 4.6 × 250 mm, 5 μm 或 4.6 mm × 150 mm, 3.5 μm 色谱柱对花青素类化合物进行分析的方法转移到使用 Agilent Poroshell 120 SB-C18, 4.6 mm × 75 mm, 2.7 μm 色谱柱的 Agilent 1260 快速高分离度液相色谱上。按比例调整梯度、进样量及流速, 并保持每一根已评价色谱柱的保留指数不变。如果从 Agilent StableBond SB-C18 4.6 × 250 mm, 5 μm 柱进行转移的话, 时间可从 100 min 减少到 20 min, 并可减少 70% 的溶剂消耗。如果从 Agilent StableBond SB-C18, 4.6 mm × 150 mm, 3.5 μm 柱进行转移的话, 运行时间可从 67 min 减少到 40 min, 并可减少 40% 的溶剂消耗。



Agilent Technologies

前言

花青素是水溶性植物色素，它使水果、花朵和植物呈现红色、蓝色和紫色。花青素的 HPLC 和 HPLC-MS 分析可用于不同种类水果的指纹鉴定，并可辅助鉴别果汁的真伪。

由于花青素作为食品抗氧化剂可能具有保健作用，因此人们对其研究的兴趣越来越浓。自然界中已发现 300 多种不同结构的花青素。花青素是一类黄酮类化合物，属于广泛分布的植物多酚类物质。黄酮醇类、黄烷-3-醇类、黄酮类、黄烷酮类和黄烷醇类是另外的黄酮类化合物，它们与花青素的氧化态形态不同。

花青素的定性和定量分析，可用于鉴别不同的蓝莓品种，并鉴定它们的质量。因此农业和酿酒业对花青素色谱分析分离的重视日益增加。最近对花青素作为抗氧化剂/抗癌剂医用价值的研究，也已引起了人们对其色谱分离的兴趣 [1]。

传统上，在这些分离中使用的低 pH 流动相（含甲酸）会引起色谱柱的降解和分离中的变化 [2]。Agilent ZORBAX StableBond SB-C18 色谱柱能够给色谱工作者提供在反相色谱分析中极低 pH 条件下的长期稳定性。许多报道的方法都采用了 50 mL/L (5%) 甲酸或 30 mL/L (3%) 磷酸做流动相。在文中，使用 Agilent Poroshell 120 SB-C18 色谱柱，并按比例调整甲酸和磷酸的用量。应用这种新方法对一些水果和果汁样品进行了分析，包括蓝莓、黑莓、小红莓、草莓和石榴汁等。

实验部分

- G1312B SL 型二元泵，流动相 A：3% 磷酸或 5% 甲酸的水溶液，B：甲醇。
- G1367E SL 型自动液体进样器 (ALS)。
- G1316B SL 型柱温箱 (TCC)，温度设定为 30°C。
- G4212C SL 型二极管阵列检测器 (DAD)，波长设置为 525, 16 nm，未使用参比波长，使用 G4212-60008 微量流通池（光程 10 mm，容积 1 μ L）。
- B.04.02 版化学工作站，可用于控制 HPLC 系统并进行数据处理。
- Agilent Poroshell 120 SB-C18 色谱柱，4.6 mm $\times$ 75 mm，2.7 μ m（部件号 689775-902）。

- Agilent ZORBAX SB-C18 色谱柱，4.6 mm $\times$ 250 mm，5 μ m（部件号 880975-902）。
- Agilent ZORBAX SB-C18 色谱柱，4.6 mm $\times$ 150 mm，3.5 μ m（部件号 863953-902）。

甲酸、磷酸购自 Sigma Aldrich 公司 (Bellefonte, PA)；甲醇购自 Honeywell, Burdick 和 Jackson High Purity 公司 (Muskegon, MI)；18 M-W Milli-Q 超纯水（Millipore 公司，Bedford, MA）；新鲜的蓝莓、黑莓、草莓、小红莓和石榴汁购自当地商店。

水果提取物的制备方法

首先进行混合：10 g 蓝莓（或其它水果），加入 10 mL 溶剂（70:28:2 的甲醇:水:甲酸），在干冰上混合 10 min，使冰升华。采用玻璃棉，用 10 mL 注射器对样品进行过滤。静置滤液 1 h 后，通过 0.2 μ m 滤膜过滤，取 50 μ L 滤液立即注入 HPLC 进行分析（4.6 mm $\times$ 250 mm 色谱柱）[3,4]，然后将制备得到的澄清溶液转移到标有 Agilent MS Analyzed 的样品瓶中（部件号 5190-2278）。

$$\text{公式 1: } k^* = (t_G F) / (d/2)^2 L (\Delta\%B)$$

式中：

t_G 梯度运行时间

F 流速

L 柱长

d 柱内径

$\Delta\%B$ 梯度运行过程中有机溶剂含量的变化

图 1 显示了使用全多孔的 5 μ m、3.5 μ m SB-C18 色谱柱和较短的、表面多孔的 Agilent Poroshell 120 SB-C18 2.7 μ m 色谱柱对蓝莓提取物进行分析的色谱图。进样量与柱体积成正比。由于它们具有相同的键合相，因此两种色谱柱的选择性应极为相似 [5,6,7]。Agilent ZORBAX StableBond SB-C18 色谱柱尤为适用于极低 pH 流动相的分析条件。在之前的报道中曾说明过，Poroshell 120 色谱柱在大约一半的压力下，可达到 1.8 μ m 全多孔色谱柱峰容量的 90% 左右。此外，Poroshell 120 色谱柱的柱效是 3.5 μ m 色谱柱的两倍 [6,7]。在文中，展示了从 5 μ m 填料的长色谱柱到较短的 3.5 μ m 填料色谱柱再到更短 Poroshell 120 色谱柱的应用渐变过程。根据色谱柱长度（内径保持不变）按公式 1 计算的比例调整洗脱梯度，使保留指数 (k') 保持不变。

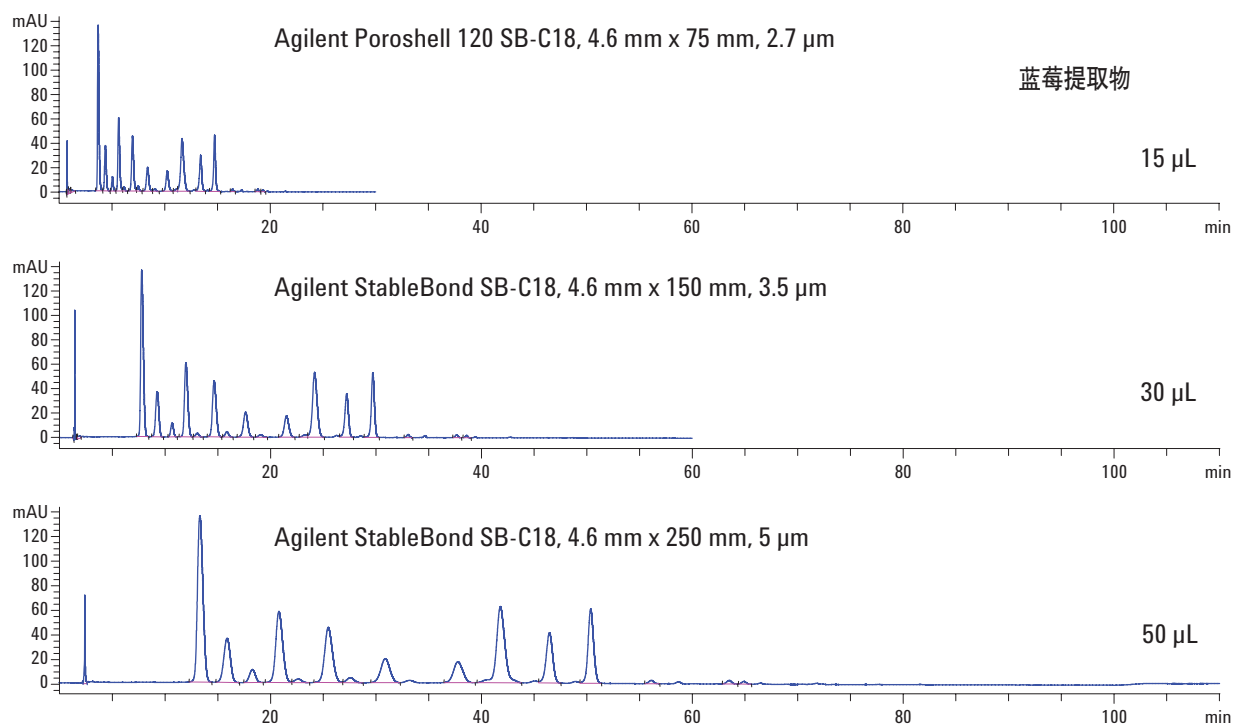


图 1. 使用全多孔和表面多孔 stableBond C18 色谱柱对蓝莓中花青素的分析。柱规格分别为 250 mm 5 μm ，150 mm 3.5 μm 和 75 mm 2.7 μm 以 1 mL/min 的流速对青素进行分析的叠加色谱图

即使对于蓝莓提取物这种复杂的样品基质，所有峰都能用相同的分析方法被分开（尽管速度更快），这既节约了时间，又减少了溶剂消耗。表 1 列出了所用梯度的参数，时间从 97 min 缩短至 29 min。由于色谱柱使用了 2 μm 柱滤膜，所以不需要额外的样品制备。这些滤膜比全多孔柱上使用的 3 μm 滤膜更耐堵塞 [8]。

表 1. 图 1、2 和 3a 中使用参考文献 3 中的色谱条件，按比例调整的磷酸梯度

柱长	4.6 mm × 250 mm	4.6 mm × 150 mm	4.6 mm × 75 mm	4.6 mm × 75 mm	4.6 mm × 75 mm
粒径	5	3.5	2.7	2.7	2.7
部件号	880975-902	863953-902	689775-902	689775-902	689775-902
流速	1	1	1	1.5	2
最高耐压	183 bar	236 bar	236 bar	349 bar	448 bar
进样量	50	30	15	15	15
% B	时间	时间	时间	时间	时间
23	0	0	0	0	0
26	35	21	10.5	7.5	5.25
60	97	58	29.1	20	10

图 2 中流速或线速度在逐渐增加。在之前的报道中已经说明，对于 Agilent Poroshell 120 EC-C18 4.6 mm 色谱柱，流速在 1.5-2.5 mL/min 范围内时，线速度越大，峰容量越大 [9]。应用公式 1 并保持 k' 值不变，则可使分离保持一致。正如色谱图中所示，在这种情况下，50% 甲醇和 2 mL/min 的流速使压力达到最大值 448 bar。然而流速在 1.5 mL/min 时，压力最大值在 400 bar 以下。实验中所用的梯度如表 1 所示。

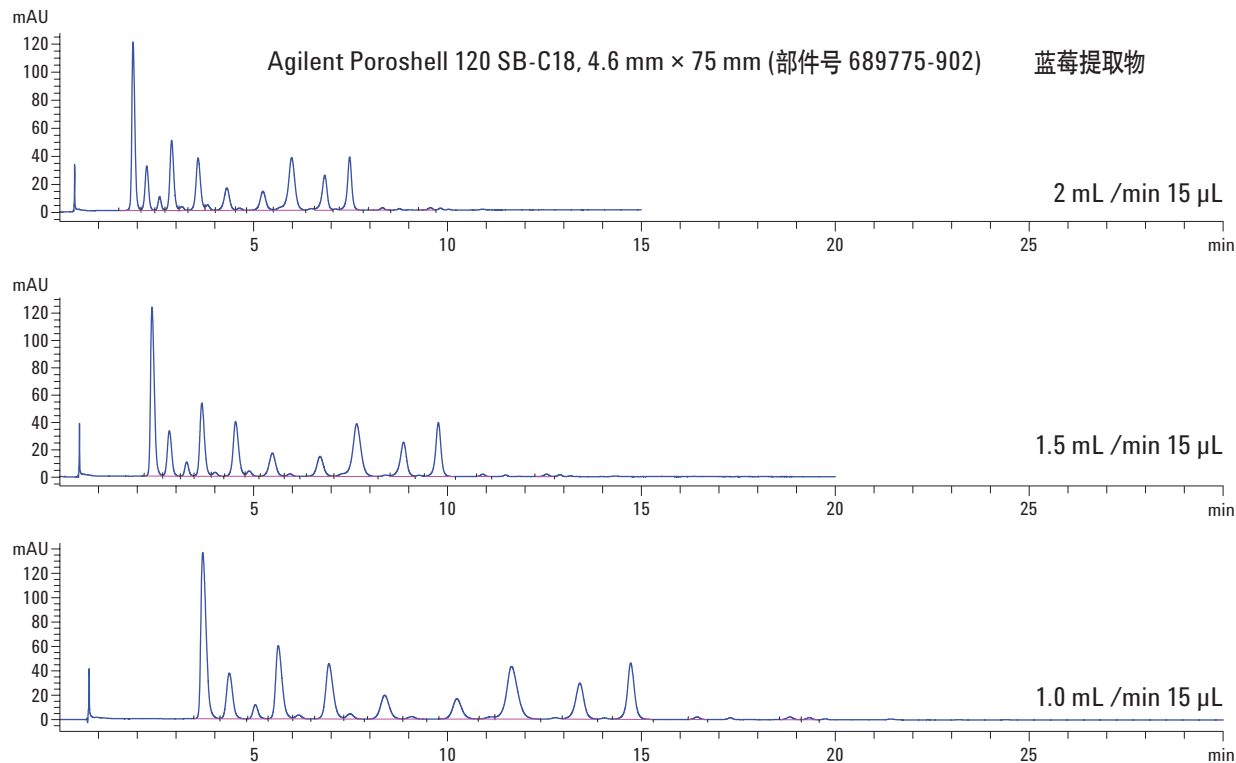


图 2. 使用 Agilent Poroshell 120 SB-C18 4.6 mm × 75 mm 2.7 μm 色谱柱以不同的流速分析蓝莓提取物中花青素的叠加色谱图

图 3a 为使用表 1 中流速为 1.5 mL/min 方法分析实际样品的色谱图。用酸化甲醇制备蓝莓、黑莓、小红莓和草莓样品 [3, 4]。石榴汁无需进一步处理, 可直接进样。如图 1 所示, 复杂的蓝莓样品色谱图大约有 20 个色谱峰 (16 个主峰, 4 个小峰)。Kalt 的研究表明越是趋向野生和生长条件恶劣的蓝莓品种, 花青素含量越多 [4]。黑莓与之前报道的一样, 种植品种只有很少的色谱峰 [10]。小红莓具有一些独特的成分 (cyd-3-gal, cyd-3-glu, cyd-3-arab, pnd-3-gal,

pnd-3-glu, pnd-3-arab), 在参考文献 10、11、12 和 13 中也有相关描述。草莓的测定结果也与先前报道数据一致。图 3b 显示使用 5% 甲酸时, 对梯度洗脱程序稍作调整即可得到相似结果。原始梯度流速为 1.5 mL/min, 且没有增加流动相的线速度。原始和按比例调整的梯度洗脱程序见表 2。用甲酸代替磷酸可实现与质谱联用进行组分鉴定, 但不论采用哪种流动相改性剂, 得到的指纹图谱结果是相似的。

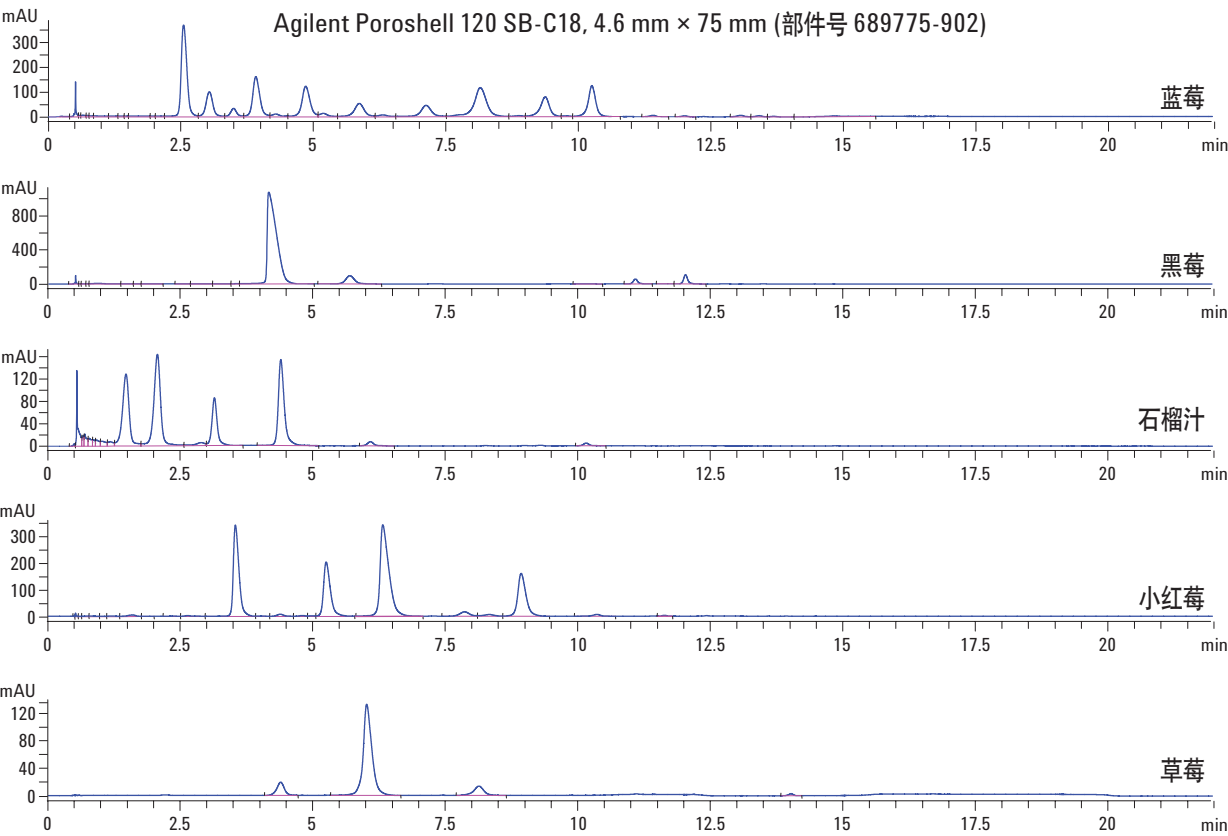


图 3a. 使用 Agilent Poroshell 120 SB-C18 色谱柱和 H_3PO_4 改性剂对不同样品中花青素进行梯度洗脱的叠加色谱图

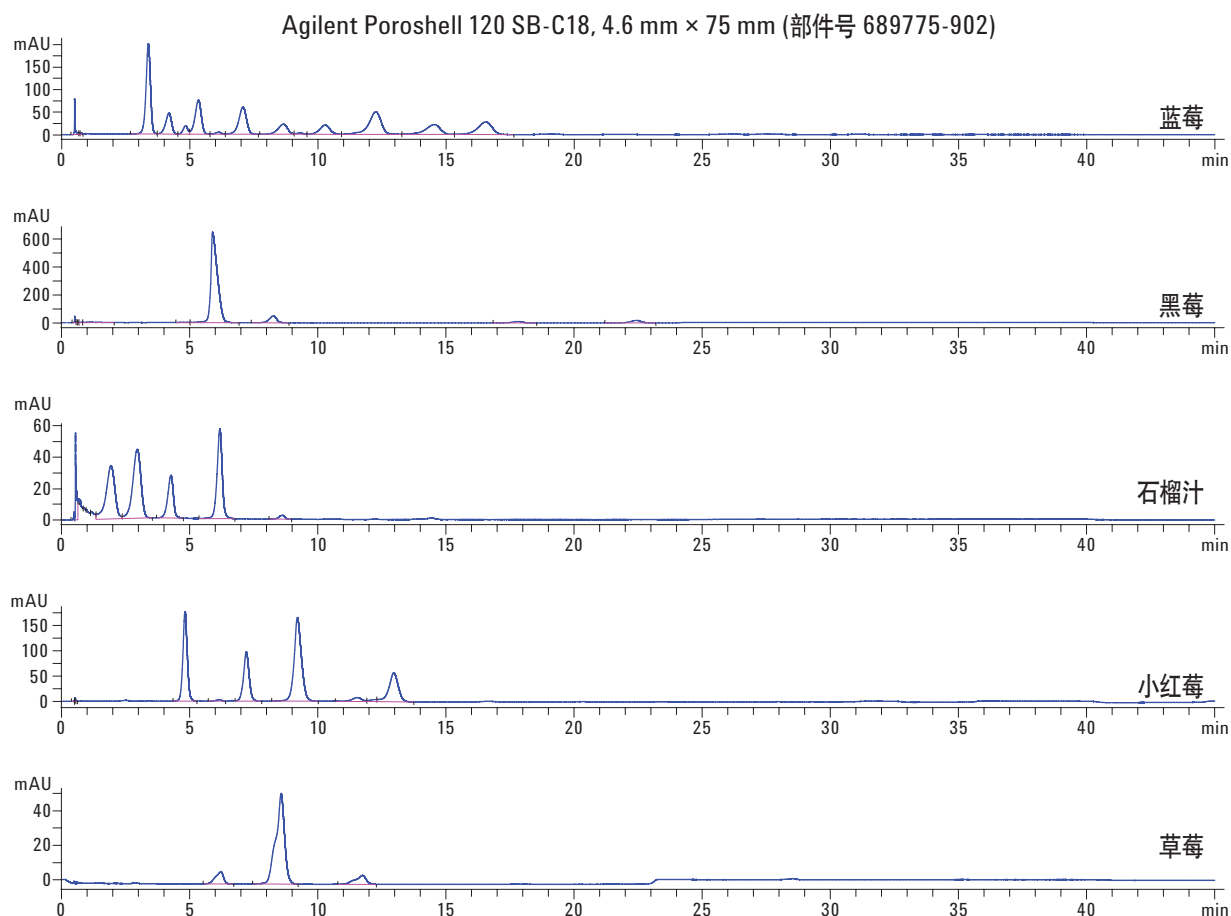


图 3b. 使用 Agilent Poroshell 120 SB-C18 色谱柱和 HCO_2H 改性剂对不同样品花青素进行梯度洗脱的叠加色谱图

表 2. 图 3b 使用参考文献 4 中的色谱条件, 按比例调整的甲酸梯度

柱长	4.6 x 250	4.6 x 75
粒径	5	
部件号	880975-902	68775-902
流速	1.5	1.5
最高耐压	274 bar	349 bar
进样量	50	15
%B	时间	时间
14	0	0
17	10	6
23	35	21
47	65	39
14	67	40.2

结论

与常规的全多孔填料色谱柱相比, 表面多孔填料 HPLC 色谱柱具有众多优势。表面多孔的 Agilent Poroshell 120 SB-C18, 粒径 $2.7\ \mu\text{m}$ 色谱柱拥有与 Agilent ZORBAX StableBond SB-C18 色谱柱相似的选择性。使用 Poroshell 120 SB-C18 色谱柱对花青素进行分析, 结果表明在减少每个样品溶剂消耗的同时可进行更快速分析。将这一分析应用到区分植物品种 [4] 或分析成百个每个样品需要超过 1 小时运行时间的各种食物样品 [10, 12] 时, 我们可以很容易地感受到分析更快速及更少溶剂消耗的重要性。这样可以节省大量时间或允许同等时间内鉴别更多植物品种。用甲酸作为流动相添加剂将可以联用质谱进行组分的进一步鉴定。

参考文献

1. Ronald E. Wrolstad, Ph.D., "The Possible Health Benefits of Anthocyanin Pigments and Polyphenolics," The Linus Pauling Institute Oregon State University, <http://lpi.oregonstate.edu/ss01/anthocyanin.html>.
2. J. P. Goiffon, M. Brun, and M. J. Bourrier, *J. Chromatography*. 537,101-121, 1991.
3. Robert D. Ricker, "花青素的高效快速分离", 安捷伦科技, 2002 年 4 月 25 日, 5988-6362CHCN。
4. W. Kalt, J. E. McDonald, R. D. Ricker, and X. Lu, "Anthocyanin content and profile within and among blueberry species," *Can. J. Plant Sci.* 79: 617–623.
5. Anne E. Mack and William J. Long and "Rapid Tea Analysis on Poroshell 120 SB-C18," 2011 年 4 月 14 日, 安捷伦科技出版物 5990-7842EN。
6. Anne E. Mack 和 William J. Long "使用安捷伦 Poroshell 120 EC-C18 表面多孔色谱柱对食品和饮料添加剂进行快速低压分析", 2010 年 7 月 8 日, 安捷伦出版号 5990-6082CHCN。
7. 应用简报, "Transfer of Methods between Poroshell 120 EC-C18 and ZORBAX Eclipse Plus C18 Columns," 2011 年 2 月 9 日, 安捷伦出版物 5990-6588EN。
8. Dorothy J. Phillips, Mark Capparella, Uwe D. Neue, Zoubair El Fallah, "A new small particle packing for faster analysis with high resolution," *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 15 (1997) 1389-1395.
9. William Long 和 Anne E. Mack, "使用氨基苯 Poroshell 120 EC-18 色谱柱快速分析环境中能够的酚类", 2010 年 8 月 31 日, 安捷伦出版号 5990-6156CHCN。
10. Xianli Wu and Ronald L. Prior, Systematic Identification and Characterization of Anthocyanins by HPLC-ESI-MS/MS in Common Foods in the United States: Fruits and Berries, *J. Agric. Food Chem.* 2005, 53, 2589-2599.
11. Ronald W. Durst and Ronald E. Wrolstad, "Separation and Characterization of Anthocyanins by HPLC," *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*
12. Xianli Wu, Gary R. Beecher, Joanne M. Holden, David B. Haytowitz, Susan E. Gebhardt, and Ronald L. Prior, "Concentrations of Anthocyanins in Common Foods in the United States and Estimation of Normal Consumption", *J. Agric. Food Chem.* 2006, 54, 4069-4075.
13. Victor Hong and Ronald E. Wrolstad, "Use of HPLC Separation/Photodiode Array Detection for Characterization of Anthocyanins," *J. Agric. Food Chem.* 1990, 38, 708-715.

更多信息

如需了解更多有关我们产品和服务的信息, 请访问我们的网站
www.agilent.com/chem/cn。

www.agilent.com/chem/cn

安捷伦对本材料中可能包含的错误，以及由于提供或使用该材料所造成的直接或间接的损失概不负责。

本文中的信息、描述及性能指标等如有变更，恕不另行通知。

© 安捷伦科技（中国）有限公司，2011

2011 年 6 月 27 日中国印刷

5990-8249CHCN



Agilent Technologies