

使用 Agilent 1260 Infinity 混合型 SFC/UHPLC 系统与质谱检测分析植物油中的抗氧化剂

应用简报

食品分析与农业

作者

Maria Rambla-Alegre,
Melissa N. Dunkle,
Gerd Vanhoenacker,
Frank David 和 Pat Sandra
色谱研究所
Kennedypark 26
B-8500 Kortrijk
Belgium

Martin Vollmer
安捷伦科技有限公司
Waldbronn, Germany



摘要

本应用简报展示了 SFC 和 UHPLC 在植物油样品的抗氧化剂分析中的互补性。Agilent 1260 Infinity 混合型 SFC/UHPLC 系统与单四极杆质谱检测相结合，能够在超临界流体色谱 (SFC) 和超高效液相色谱 (UHPLC) 之间自动切换，同时利用这两种技术进行分析。

实现了良好的质谱峰面积重现性 ($RSD < 5.0\%$) 和灵敏度，证明该系统可用于定性分析以及定量分析。使用标准溶液和植物油展示了性能数据。采用简单的甲醇萃取法，植物油样品中的所有抗氧化剂均获得了良好的回收率。

前言

Agilent 1260 Infinity 混合型 SFC/UHPLC-MS 系统代表了先进的填充柱 SFC，可提供类似于 HPLC 的灵敏度、600 bar 的性能范围以及出色的仪器和方法稳定性，这些均在基于液相色谱的系统上实现，该系统实现了真正的模块化且具有高灵活性¹。

使用填充柱的 SFC 是液相色谱技术的一个重要补充。尤其在手性和正相分离方面，SFC 展示了其应用潜力。本应用简报介绍了通过在 SFC 和 UHPLC 模式之间进行切换，在一个运行序列中获得有关分析物混合物的互补性数据。采用此混合型系统可避免投资两个独立的系统，消除了系统之间变异性的影响，大大节省了成本和实验室空间¹。

维生素 E 作为抗氧化剂具有重要作用。不同的立体异构体（同效维生素）在各种植物油中非常常见，展示了维生素的活性差异。本应用简报介绍了使用 1260 Infinity 混合型 SFC/UHPLC/MS 系统在 SFC/MS 和 LC/MS 模式下对植物油中 14 种抗氧化剂的分析。由于母育酚（生育酚和生育三烯酚）的生物活性和化学性质各不相同，因此单独测定并定量分析各种同效维生素非常重要。八种母育酚只能在 SFC-MS 模式下得到完全分离。在这种情况下，利用 SFC 进行分离显著快于使用 UHPLC 分离。

实验部分

溶液

用甲醇配制各种抗氧化剂的储备液（浓度为 1–5 mg/mL，取决于溶解

度）。然后将这些储备液混合，配制成含有 14 种化合物的测试混标。大多数实验均使用浓度为 100 ppm 的溶液，但是，我们仍需配制浓度为 0.1–100 ppm 的系列稀释溶液。表 1 列出了色谱峰归属、化学名称和分子量。对于加标样品，在萃取之前，加入溶于溶剂中的抗氧化剂储备液。

油样品购自当地超市。称取 100 mg 油样品并加入 1 mL 溶剂，对油样品和加标油样品进行萃取。将该混合物涡旋混合 30 秒，静置 2 分钟后，再次涡旋混合 30 秒。然后将样品在 5000 × g 下离心 5 分钟，并将上清液转移至自动进样器样品瓶中以备进样。

峰归属	化学名称	CAS	分子量 (g/mol)	供应商
1	没食子酸丙酯 (PG)	121-79-9	212.2	Sigma
2	叔丁基氢醌 (TBHQ)	1948-33-0	166.2	Sigma
3	6-羟基-2,5,7,8-四甲基色满-2-羧酸 (TROLOX)	53188-07-1	250.3	Sigma
4	丁基羟基苯甲醚 (BHA)	25013-16-5	180.2	Sigma
5	没食子酸辛酯 (OG)	1034-01-1	282.3	Sigma
6	丁羟甲苯 (BHT)	128-37-0	220.3	Sigma
7	没食子酸月桂酯 (LG)	1166-52-5	338.4	Sigma
8	δ -生育三烯酚 (δ -TT)	25612-59-3	396.6	Cayman Chem.
9	γ -生育三烯酚 (γ -TT)	14101-61-2	410.6	Cayman Chem.
10	α -生育三烯酚 (α -TT)	58864-81-6	424.7	Cayman Chem.
11	δ -生育酚 (δ -TP)	119-13-1	402.6	Calbiochem
12	γ -生育酚 (γ -TP)	54-28-4	416.7	Calbiochem
13	β -生育酚 (β -TP)	148-03-8	416.7	Calbiochem
14	α -生育酚 (α -TP)	59-02-9	430.7	Calbiochem

表 1
分析的抗氧化剂

系统配置

只需添加一个包含通用阀驱动 (G1170A) 和阀头 (G4232B) 的 2 位/10 通阀以及第二个泵 (G1311B), 即可将 1260 Infinity 分析型 SFC 系统 (G4309A) 转化为混合型 SFC/UHPLC 系统。该系统可在 UHPLC 模式 (图 1a) 或 SFC 模式 (图 1b) 下运行。通过切换 2 位/10 通阀, 即可完成两种模式之间的交替, 可以在相应方法开始时作为方法参数对其进行编程¹。柱温箱配备 2 位/6 通色谱柱切换阀, 该阀能够针对各种模式选择合适的色谱柱。

将 SFC 与 MS (或 ELSD) 联用时, 应考虑进行一些改进²。将毛细管加热装置安装于质谱进样口的正前方。在 SFC 模式下, 主要由二氧化碳组成的流出物在进入质谱离子源之前被减压。体积膨胀的 CO₂ 产生显著的冷却效应, 导致传输线冷冻。另外, 在紫外检测器和 BPR 之间将补偿流加入系统中。需要使用这一额外的补偿流来获得最佳的保留时间和峰面积重现性。

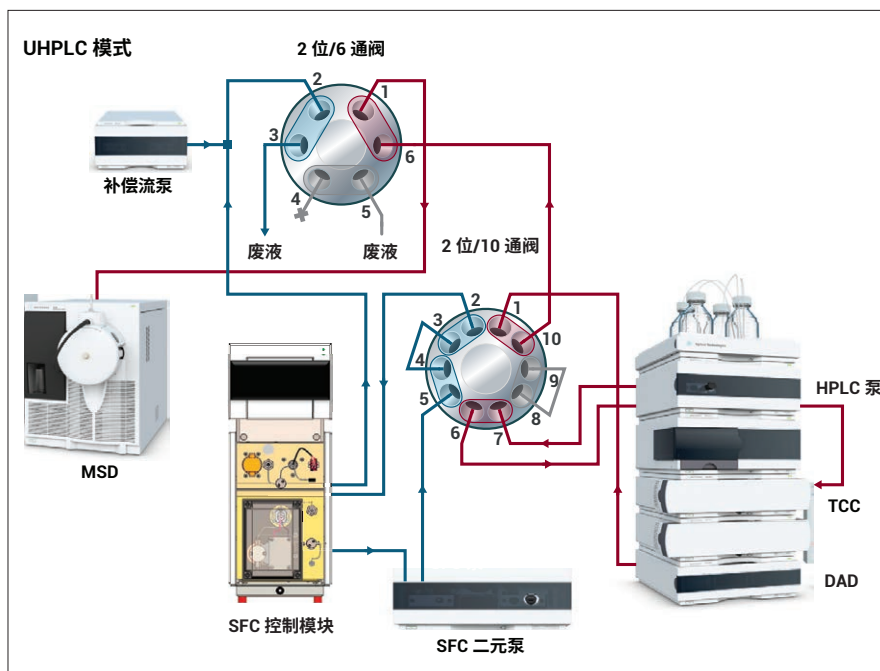


图 1a
混合系统在 UHPLC/MS 模式下的示意图

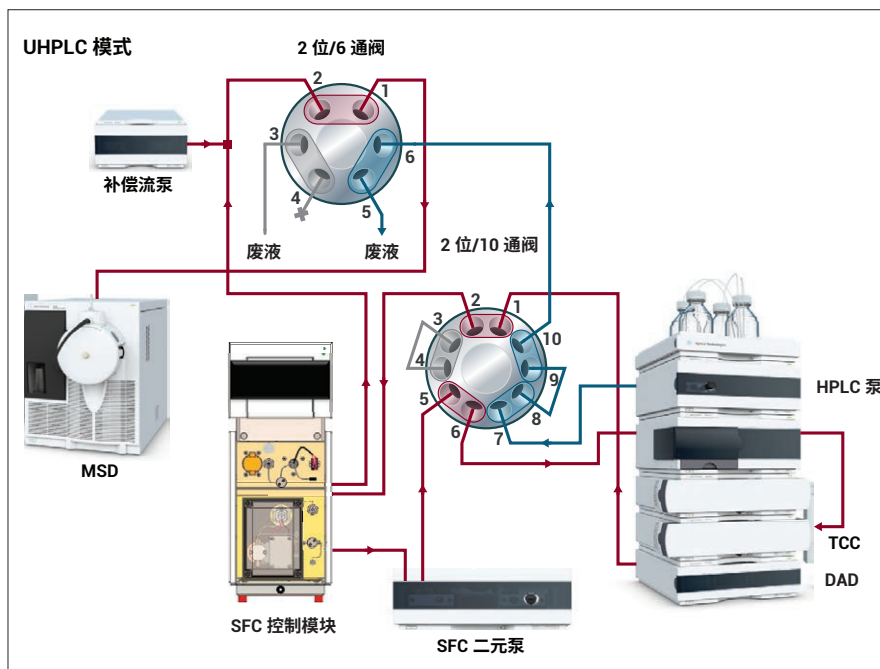


图 1b
混合系统在 SFC/MS 模式下的示意图

将 0.12 mm × 105 mm 不锈钢毛细管 (部件号 5021-1820) 从紫外检测器连接至安捷伦零死体积 T 形管 (部件号 0100-0969)。利用 Agilent G1311B 泵供应补偿流, 并使用 0.25 mm × 800 mm 不锈钢毛细管 (部件号 5065-9930) 将该泵连接至 T 形管。利用 0.12 mm × 400 mm 不锈钢毛细管 (部件号 5021-1823) 将 T 形管连接至 BPR。Caloratherm 预加热器套管位于 0.17 mm × 10 mm 不锈钢毛细管 (部件号 5061-3361) 的外围, 并且包含预加热器装置的管线直接连接至质谱进样口。此外, 需要添加如图 1a 和 1b 所示的 2 位/6 通阀, 在质谱检测之前连接来自 SFC 和 UHPLC 的流路。

借助 SFC 配置中的加热装置和补偿流, 将不会发生冷冻, 并且将显著改善质谱重现性。

实验条件

表 3 列出了用于分离包含 14 种组分的抗氧化剂混合物和植物油样品的方法参数。

Agilent 1260 Infinity 混合型 SFC/UHPLC 系统

G4309A	Agilent 1260 Infinity 分析型 SFC 系统	
G1311B	Agilent 1260 Infinity 四元泵 (可用 G1312B、G1310B、G4220A/B 和 G4204A 替代)	
G1170A	Agilent 1290 Infinity 阀驱动	
G4232B	2 位/10 通阀阀头, 600 bar	
G6130B	单四极杆 LC/MS	
G4231A	2 位/6 通阀阀头, 600 bar	
G1170A	Agilent 1290 Infinity 阀驱动 (需要第二个阀驱动来支持 2 位/6 通阀阀头)	
AG1	Caloratherm ²	可通过 RIC 获得 ¹
AG004	预加热器 ²	可通过 RIC 获得 ¹

¹ 联系 info@richrom.com 获取更多信息

² 可使用 G1316A 或 G1316C 热交换器替代毛细管加热器

表 2
系统模块

条件	UHPLC 模式	SFC 模式
进样量:	15 µL (柱头进样 5 µL)	15 µL (柱头进样 5 µL)
色谱柱:	Agilent Poroshell 120 EC-C18, 2.1 × 100 mm, 2.7 µm (部件号 695775-902)	Agilent ZORBAX Rx-SIL, 4.6 × 250 mm, 5 µm (部件号 880975-901)
BPR:	90 bar*	120 bar
SFC 流速:	-	2 mL/min
UHPLC 流速:	0.4 mL/min	1 mL/min
超临界流体:	-	CO ₂
改性剂:	(A) 0.1% FA 的水溶液 (B) 0.1% FA 的甲醇溶液	甲醇
UHPLC 梯度:	15 分钟内 20%–100% B (总共 25 分钟)	
SFC 梯度:		3%–12% B (0–25 分钟)
柱温:	30 °C	50 °C
补偿流流速:		0.1% FA 的甲醇溶液, 0.8 mL/min
Caloratherm:		60 °C
DAD:	292/10 nm, 参比 400/50 nm	292/10 nm, 参比 400/50 nm
APCI:	毛细管电压 ± 4000 V 电晕电流 = 4.0 µA (+), 20 µA (-) 干燥气 = 6.0 L/min, 325 °C 雾化器压力 = 55 psig 蒸发器温度 = 350 °C	毛细管电压 ± 4000 V 电晕电流 = 4.0 µA (+), 20 µA (-) 干燥气 = 6.0 L/min, 325 °C 雾化器压力 = 60 psig 蒸发器温度 = 350 °C

* 仅用于维持 BPR 的正常运行。该压力不应用于 UHPLC 色谱柱

表 3
混合型系统的实验条件

结果与讨论

对包含 14 种组分的抗氧化剂混合物进行分析，以证明 1260 Infinity 混合型 SFC/UHPLC/MS 系统的易用性、互补性和性能。采集紫外和质谱数据 (APCI)，利用质谱数据确认化合物身份。图 2 显示了抗氧化剂混标 (10 µg/mL) 在 UHPLC 模式下的分离结果。

建立校准曲线，结果表明在 SFC 和 LC 模式下均获得了优异的线性。表 4 汇总了 UHPLC 结果。

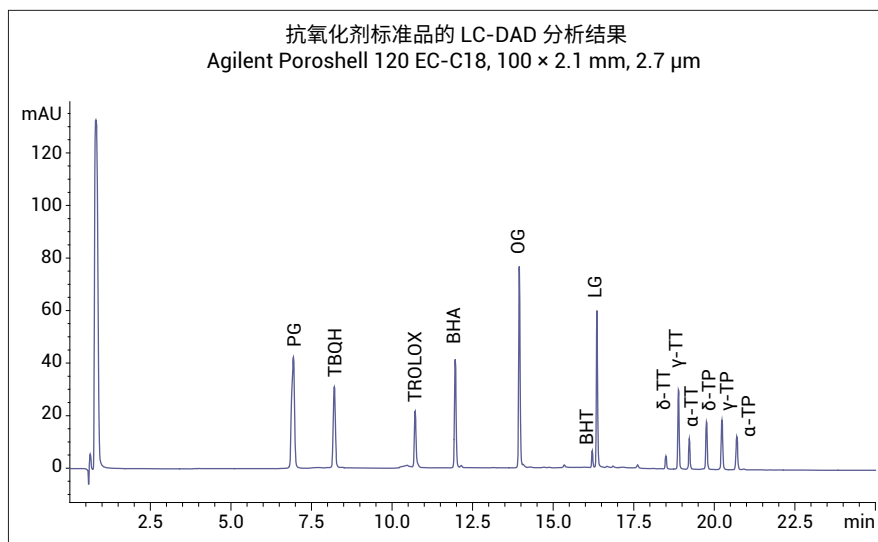


图 2
利用 LC-DAD 分析 14 种抗氧化剂的混合物 (10 µg/mL) 所得到的结果

	线性 (R ²) ¹	重现性 (% RSD) ²	重现性 (% RSD) ³	回收率 5 mg/kg (%)	重现性 (% RSD)	回收率 100 mg/kg (%)	重现性 (% RSD)
PG	0.99977	3.7	4.11	102.8	2.0	103.3	0.7
TBHQ	0.99807	4.4	4.8	72.6	20	87.2	23
TROLOX	0.99969	5.0	4.3	94.9	17	92.6	6
BHA	0.99978	0.7	2.1	105.2	4.5	100.8	1.2
OG	0.99978	3.0	4.5	101.2	1.6	104.0	1.2
BHT	0.99981	4.9	1.7	104.7	5.6	99.4	2.0
LG	0.99974	0.8	1.4	99.97	7.2	104.4	0.9
δ-TT	0.99965	4.5	2.2				
γ-TT	0.99969	1.8	2.5				
α-TT	0.99953	2.1	2.5				
δ-TP	0.99972	1.8	2.3				
γ-TP 和 β-TP	0.99987	1.8	2.7				
α-TP	0.99943	1.3	2.6				

¹ 0.1、0.5、1、5、10、25、50 和 100 µg/mL 标准溶液，每种浓度进样 1 次 (UV)

² 6 次连续进样，0.5 µg/mL

³ 6 次连续进样，25 µg/mL

* 未计算生育酚和生育三烯酚的回收率，因为它们已经存在于油样品中

表 4
LC 模式方法性能数据

使用抗氧化剂标准溶液和加标油样品考察方法的重现性和线性。所有抗氧化剂的检测限等于或低于 0.1 µg/mL。这相当于油或脂肪样品中的 1 mg/kg 左右或更低。对油样品和加标油样品的提取物进行分析，以确定回收率和准确度（图 3）。在油样品中加入 5 mg/kg 和 100 mg/kg 的各种抗氧化剂，并对提取物中的检出量与相同浓度的标准溶液进行比较。

紫外和质谱结果获得了类似的分离度和峰宽，并在 0.1–100 ppm 范围内表现出良好的线性。对于测试混标中的所有组分，MSD 的灵敏度比紫外检测的灵敏度高出 10 倍左右。因此，利用 APCI MS 确认峰的归属。需要重点注意的是，加标样品中的两种化合物（TBHQ 和 TROLOX）在序列分析过程中略有分解，导致这些化合物的回收率较低。

尽管 LC 方法的性能出色，但是并非所有生育酚都得到分离（β-TP 和 γ-TP 发生共洗脱）。另外，观察到某些其他共洗脱现象（BHA 和 α-生育酚，图 4）。利用 SFC-MS 模式实现了八种母育酚的完全分离，该模式能够用于分析不同油提取物（煎炸油、葵花籽油、菜籽油和 Tocomix）中的各种母育酚。Tocomix 是葵花籽油中母育酚的一种商业化混合物（AOMS, S.A., Argentina）。

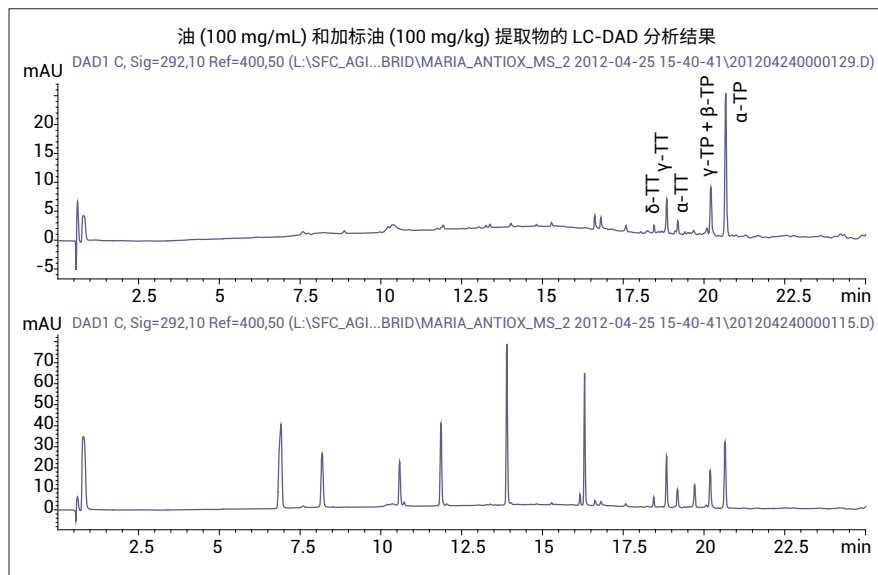


图 3 利用 LC 方法分析油 (100 mg/mL) 和加标煎炸油 (100 mg/kg) 提取物所得到的结果

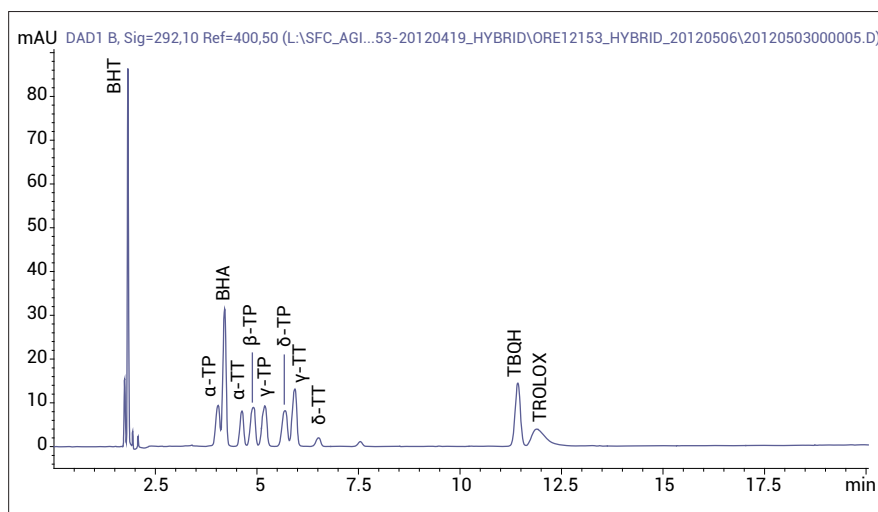


图 4 利用 SFC-DAD 分析 14 种抗氧化剂的混合物 (10 µg/mL) 所得到的结果

生育酚和生育三烯酚的极性主要受色原烷醇环中甲基基团数量的影响，并且在较小程度上受甲基基团空间效应的影响以及生育三烯酚的不饱和侧链相比于生育酚而言极性略有提高的影响。最难分离的化合物是 β -母育酚和 γ -母育酚（图 5 和 6），因为它们的环结构中具有三个甲基基团。 $[M-H]^+$ 离子的 APCI 质荷比 (m/z) 对于 α -、 β -、 γ - 和 δ -生育酚分别为 429、415、415 和 401，对于 α -、 β -、 γ - 和 δ -生育三烯酚分别为 423、409、409 和 396。

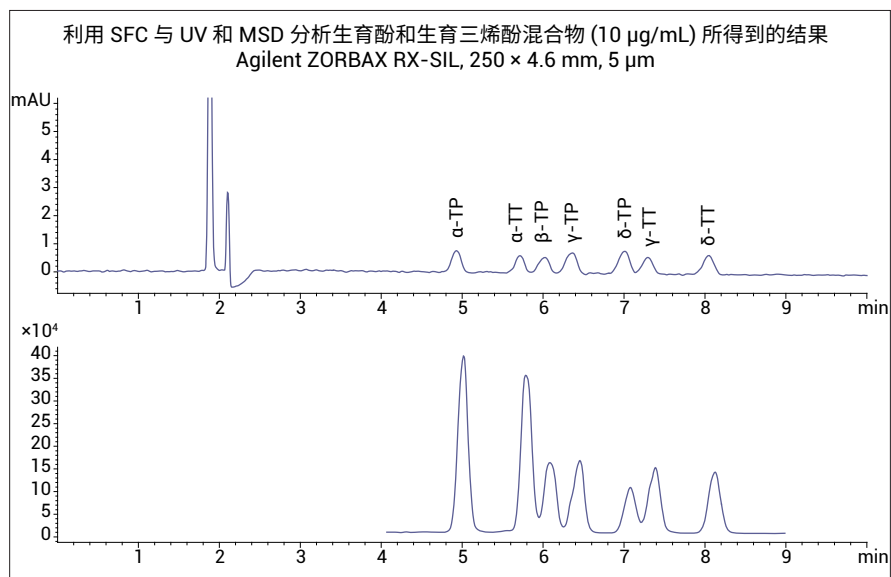


图 5
利用 SFC 与 UV 和 MSD 分析生育酚和生育三烯酚混合物 (10 $\mu\text{g/mL}$) 所得到的结果
(β -生育三烯酚无纯标准品可用)

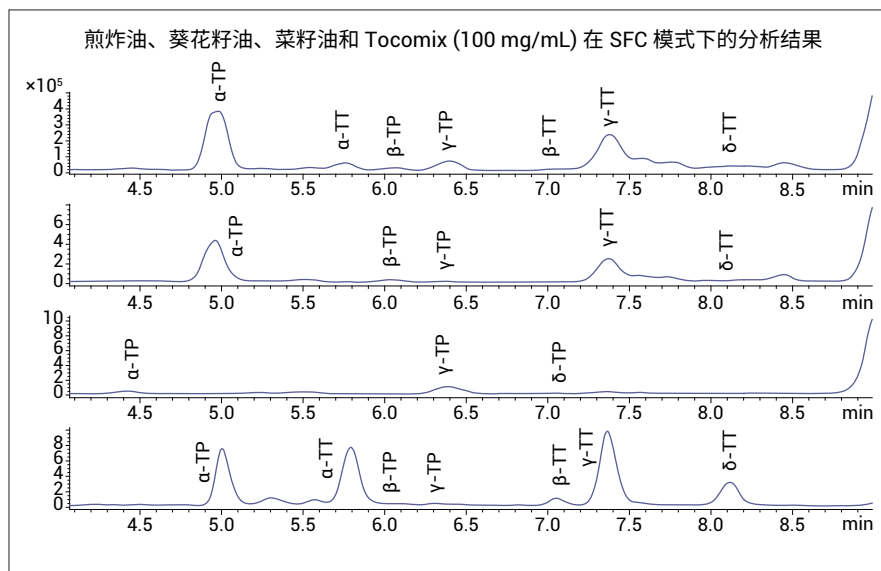


图 6
煎炸油、葵花籽油、菜籽油 (100 mg/mL) 和 Tocomix 在 SFC 模式下的分析结果

图 7 显示了利用 SFC-APCI 分析得到的煎炸油样品中 α -生育酚的质谱图。选择离子 m/z 429 进行进一步分析, 该离子归属于 α -生育酚的初始质子化以及随后的脱氢作用所形成的 $[M-H]^+$ ^{4,5}。

执行分离时, 在 UV 和 MSD 中获得了相似的分度。在 0.1–50 ppm 的范围内表现出良好的线性, R^2 值为 0.99。总体而言, LC/MS 模式和 SFC/MS 模式的检测限 (LOD) 处于相同的数量级。结果表明, 两种技术对复杂的分析物混合物具有出色的分离能力和良好的重现性。需要重点注意的是, 生育酚和生育三烯酚只能在 SFC-MS 模式下得到完全分离。

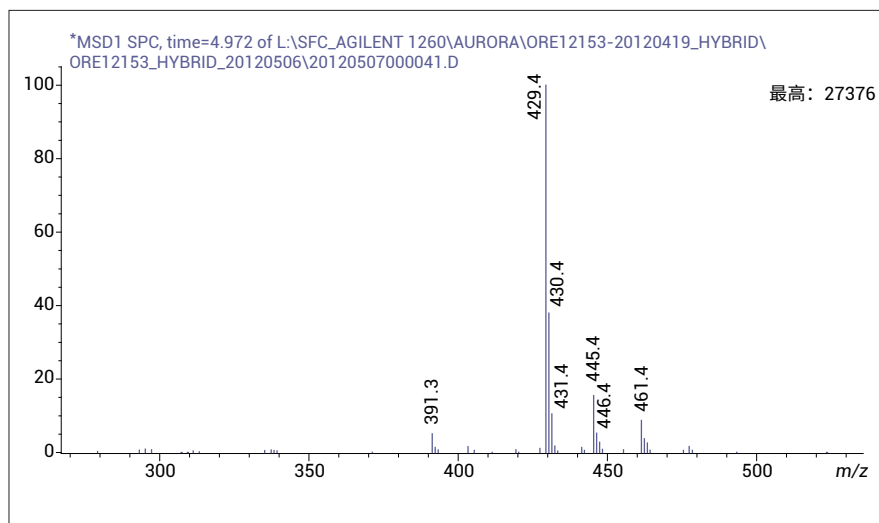


图 7
利用 SFC 模式得到的煎炸油中 α -生育酚的质谱图

	线性 (R^2) ¹	重现性 (% RSD) ²	重现性 (% RSD) ³	煎炸油 ⁴		葵花籽油 ⁴		菜籽油 ⁴		Tocomix	
				回收率 (mg/kg)	RSD (%)	回收率 (mg/kg)	RSD (%)	回收率 (mg/kg)	RSD (%)	回收率 (ppm)	RSD (%)
δ -TT	0.99993	3.3	2.7	24	5.5	9	4.9	-	15.4	4.2	
β -TT*	不适用	不适用	不适用	-	-	-	检出				
γ -TT	0.99975	4.6	4.4	96	1.7	70	6.0	-	43.3	5.2	
α -TT	0.9994	3.9	2.9	19	4.3	-	-	20	4.6		
δ -TP	0.99942	3.8	4.4	-	-	0.5	5.8	-			
β -TP	0.99764	4.7	4.7	3	5.8	9	5.6	-	0.4	4.4	
γ -TP	0.99805	3.3	4.0	42	6.0	2.1	5.4	40	5.3	0.2	5.3
α -TP	0.99692	2.1	4.5	165	3.2	124	4.0	2.5	2.9	16.4	3.6

¹ 0.1、0.5、1、5、10、25、50 $\mu\text{g/mL}$ 标准溶液, 每种浓度进样一次 (MS)

² 6 次连续进样, 0.5 $\mu\text{g/mL}$

³ 6 次连续进样, 25 $\mu\text{g/mL}$

⁴ 6 次连续进样

* 无定量数据。无可用的纯标准物质

表 5
SFC 模式方法性能数据

结论

Agilent 1260 Infinity 混合型 SFC/UHPLC/MS 系统可在一台仪器上由 SFC 和 UHPLC 获得互补性数据，是一种出色的分析解决方案。对不同来源的植物油样品以及加标植物油样品进行萃取，并计算抗氧化剂的回收率。所有抗氧化剂均获得了良好的回收率。

利用 UHPLC 对酚类抗氧化剂进行分析。在该模式下，并非所有生育酚都能得到分离。仅在执行 SFC-MS 模式时，同效维生素才得以完全分离。良好的灵敏度和高稳定性证明，混合型 SFC/UHPLC/MS 非常适合在定量以及定性分析中分离并检测所有抗氧化剂异构体。

参考文献

1. M. Vollmer, M. Becker. Agilent 1260 Infinity Hybrid SFC/UHPLC System (Agilent 1260 Infinity 混合型 SFC/UHPLC 系统)，安捷伦科技公司出版号 5990-9514EN，**2012**
2. M. Dunkle, G. Vanhoenacker, F. David, P. Sandra, M. Vollmer. Agilent 1260 Infinity SFC/MS 解决方案，安捷伦科技公司出版号 5990-7972CHCN，**2011**
3. G. Vanhoenacker, F. David, P. Sandra, M. Vollmer. Ultrafast analysis of synthetic antioxidants in vegetable oils using the Agilent 1290 Infinity LC (使用 Agilent 1290 Infinity 液相色谱系统对植物油中的合成抗氧化剂进行超快速分析)，安捷伦科技公司出版号 5990-4378EN，**2009**
4. C. Lauridsen, S.W. Leonard, D.A. Griffin, D.C. Liebler, T.D. McClure, M.G. Traber. *Analytical Biochemistry* 289 89-95 (**2001**)
5. R. Andreoli, P. Manini, D. Poli, E. Bergamschi, A. Mutti, W. M. A. Niessen. *Anal. Bioanal. Chem* 378 987-994 (**2004**)

查找当地的安捷伦客户中心：

www.agilent.com/chem/contactus-cn

免费专线：

800-820-3278, 400-820-3278 (手机用户)

联系我们：

LSCA-China_800@agilent.com

在线询价：

www.agilent.com/chem/erfq-cn

www.agilent.com/chem/sfc

© 安捷伦科技（中国）有限公司，2017
2017年10月15日，中国出版
5991-1546ZHCN



Agilent Technologies