

Nexera UC 系统在脂溶性维生素分析中的应用

SFE-SFC-002

摘要：本实验使用岛津 Nexera UC Online-SFE-SFC 系统建立了维生素 A 乙酸酯等五种脂溶性维生素分析方法，通过考察色谱柱和流动相，选择 GL Science ODS-P 色谱柱和甲醇作为改性剂时可获得各化合物最佳分离效果。分析结果显示，维生素 A 乙酸酯等化合物 SFE 的萃取率在 86~94% 之间，维生素 A 乙酸酯等四种化合物在 2.8~55.6 μg 、维生素 E 乙酸酯在 5.6~112 μg 范围内线性良好， $R^2 > 0.997$ ，回收率在 90~101% 之间，保留时间和峰面积重复性 RSD 在 0.03~0.24% 和 4.1~13% 以内，可以作为该类药品及膳食补充剂的维生素检测方法使用。

关键词：Nexera UC SFC 脂溶性维生素

维生素是一类维持动物体正常生命形态的基本微量物质，其中脂溶性维生素如维生素 A、维生素 E 等由于化学结构关系，疏水性强、易溶于低极性有机溶剂中。该类物质常用的分析检测手段因化合物而异，如《中国药典(2015 版)》中维生素 A 用反相液相色谱，维生素 D 常用正相液相色谱法，维生素 E 使用气相色谱法等，方法多样使得同时检测此类化合物成为相关检测领域方法开发的难点。

超临界流体色谱 (Supercritical Fluid Chromatography, SFC) 是以超临界流体和少量改性剂为流动相的新型色谱分离技术。超临界 CO_2 (scCO_2) 以其安全、价廉、无毒、易制得、化学惰性等因素成为 SFC 常用的主要流动相。

超临界流体具有低黏度、高扩散性和高溶解性等特点，使得 SFC 分析，尤其对中低极性化合物分析具有快速、高效、高分离等优势。

Nexera UC Online SFE-SFC 系统是岛津最新的超临界流体色谱产品，有效的将 SFE 和 SFC 实现了在线联用，简化和统一了前处理手段，具有萃取率高、重复性好、节省溶剂和操作时间、操作界面通用性好等特点。本实验使用该系统开发了药品和保健食品中脂溶性维生素的检测方法，同传统和现行标准方法相比，该法前处理准备简单，可同时检测多种脂溶性维生素，且方法有效可靠，为多种脂溶性维生素的同时检测提供有效的分析手段，可对该类物质的定量研究提供参考。

实验部分

1.1 仪器

Nexera UC Online-SFE-SFC 系统

具体配置为：SFE-30A(超临界流体萃取单元)，LC-30ADSF(CO_2 输液泵)，LC-20ADXR(输液泵，含 LPGU 低压梯度比例阀)，DGU-20A5(在线脱气机)，CTO-20AC(柱温箱)，SFC-30A \times 2(背压调节单元)，SPD-20A(紫外检测器)，CBM-20A(系统控制器)，LabSolutions Ver5.82(色谱工作站)。

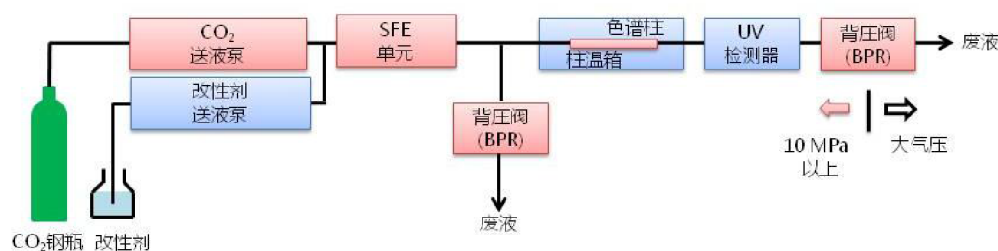


图1 Nexera UConline SFE-SFC系统及流路示意图

1.2 样品信息

本实验中共使用五种脂溶性维生素建立了分析方法，具体化合物信息如表 1 所示。取维生素 A 乙酸酯等标准品以正己烷溶解后，用乙醇稀释，配制成系列浓度样品加入萃取罐中进行分析，获得标准曲线。另选择市售的维生素 A、维生素 E 胶丸和多维元素片，进行简单前处理。对胶丸样品取出内容物少量以正己烷稀释后滴入萃取罐进行分析，多维元素片刮去薄膜包衣研碎成粉后称取少量到萃取罐进行分析。

表1 化合物信息

#	中文名	英文名	CAS#	缩略
1	维生素A乙酸酯	Vitamin A acetate	127-47-9	VAA
2	维生素A棕榈酸酯	Vitamin A palmitate	79-81-2	VAP
3	维生素E乙酸酯	Vitamin E acetate	7695-91-2	VAE
4	维生素D2	Vitamin D2	50-14-6	VD2
5	维生素D3	Vitamin D3	67-97-0	VD3

1.3 SFE 萃取条件:

色萃取剂: A-scCO₂; B-MeOH
 萃取流速: 5 mL/min
 萃取剂比例: A/B=98/2(v/v)
 静态萃取: 3 min
 动态萃取: 3 min
 萃取温度: 50°C
 萃取背压: A-14.8 MPa;B-15 MPa

SFC 色谱条件

色谱柱: GL Science ODS-P 4.6 mm I.D.×250 mm L.,
 5 μm
 流动相: A-scCO₂; B- 甲醇 流速: 3 mL/min
 柱温: 40°C 检测波长: 325 nm, 284 nm
 背压: 10 MPa
 洗脱方式: 梯度洗脱, 0%B(6 min)-2%B(9 min)-
 10%B(16 min)-50%B(16.1-17 min)

结果讨论

2.1 超临界流体萃取

待测样品装入到萃取罐中，放入 SFE-30A 超临界流体萃取单元中进行萃取。液态 CO₂ 和改性剂甲醇以 98/2(v/v) 经由输液泵输入 SFE 单元的萃取罐中，在设定温度和压力下形成超临界流体，甲醇的加入是为了调整超临界流体的溶解性、极性等性质以改善萃取效果。在稳定的温度和压力保持超临界流体充满萃取罐 3 min 进行静态萃取，然后通过 SFE 单元流路切换阀切换，萃取罐中的萃取物在 3 min 内由流经萃取罐的超临界流体洗脱，完成动态萃取。动态萃取过程中，萃取物直接进入后续 SFC 系统，全萃取过程完成后进行 SFC 分析，从而实现 SFE-SFC 的在线联用方式，见图 3 所示。

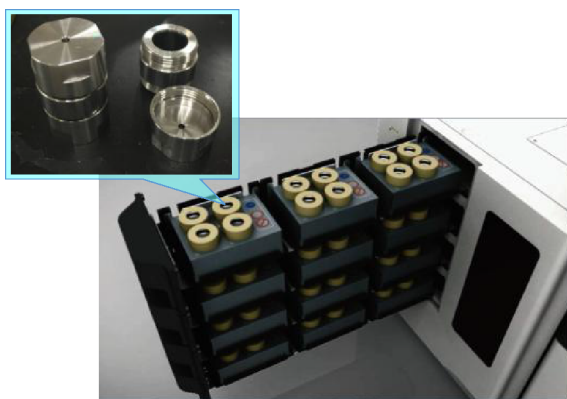


图2 超临界流体萃取罐及换架器

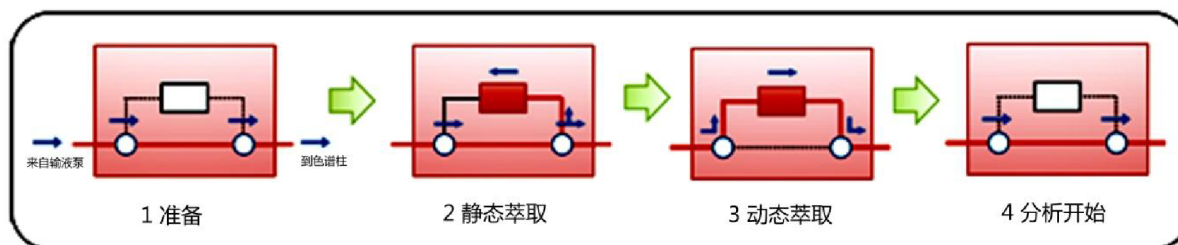


图3 超临界流体萃取过程示意图

为考察设定条件下 SFE 对五种化合物的萃取效率，通过重复对同一萃取罐内容物进行多次 SFE-SFC 联用分析(如图 4)，计算各化合物峰面积并记录于表 2，以首次萃取所得化合物峰面积对三次萃取的峰面积合计做比以表示萃取率，结果显示该条件下 SFE 方式对以上五种化合物的萃取率在 86~94% 之间。结果显示，首次萃取的萃取率同化合物在该条件下的保留时间呈负相关，即表示保留时间短、易洗脱、易溶于超临界流体中的物质，在同等分析条件下具有较高的萃取效率。

表2 五种化合物SFE萃取率(%)

	VAA	VEA	VAP	VD2	VD3
第一次萃取	94.2	88.6	89.3	86.2	86
第二次萃取	5.8	10.1	9.7	11.6	12
第三次萃取	0	1.3	1	2.2	2

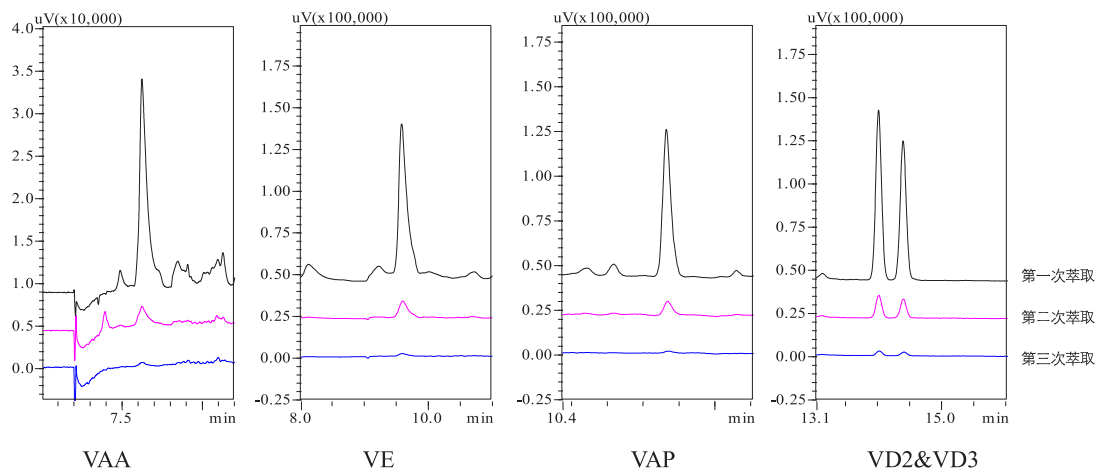


图4 SFE萃取效率考察
(检测波长: VAA-325nm;VE,VAP,VD2&VD3-284 nm)

2.2 超临界流体色谱

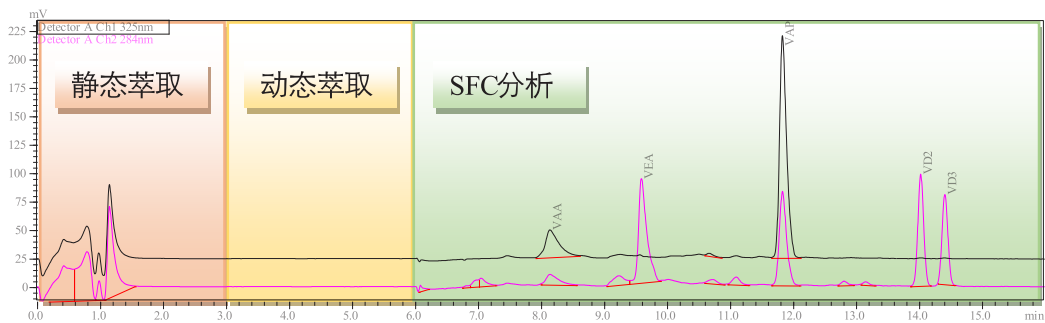


图5 五种维生素的OnlineSFE-SFC色谱图

对维生素 A 乙酸酯等五种脂溶性维生素进行 Online SFE-SFC 分析，色谱图如图 5 所示。按照设定时间程序，分析开始后的 6 min 内为萃取过程，6 min 后为 SFC 分析，SFE 到 SFC 切换无需过渡，高效衔接。以萃取罐中化合物的绝对加入量 (μg) 对检测器响应做曲线，结果如图 6 所示，五种化合物在各自加入量范围内线性良好，回归系数 R^2 在 0.997-0.999 之间。

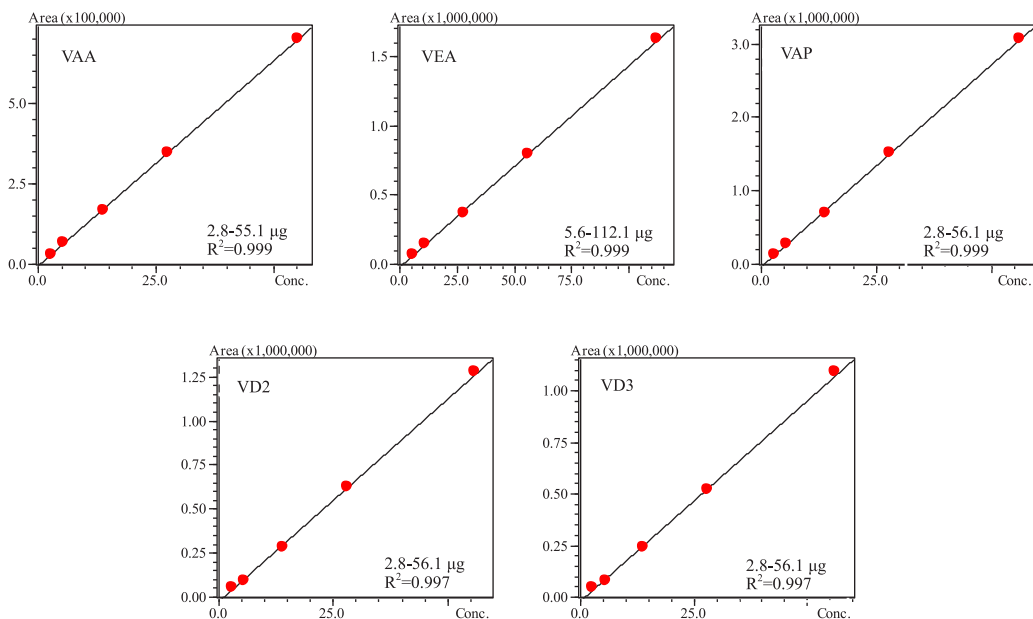


图6 五种脂溶性维生素样品标准曲线

2.3 重复性和回收率

取6个萃取罐加入相同量的五种维生素混合标样,考察 Online SFE-SFC 分析的重复性和回收率,结果如表3所示。分析结果表明,Online SFE-SFC 分析五种脂溶性维生素保留时间和峰面积的相对标准偏差在 0.03~0.24% 和 4.1~13.0% 之间,加标回收率在 90~101.1% 之间,可以满足定量分析的需求。

表3 五种脂溶性维生素重复性和回收率分析结果(n=6,%)

	VAA	VAE	VAP	VD2	VD3
保留时间(RSD)	0.24	0.15	0.10	0.04	0.03
峰面积(RSD)	13.0	5.2	4.1	4.5	5.9
回收率	94.4	101.1	100	90.5	90.5

2.4 实际样品

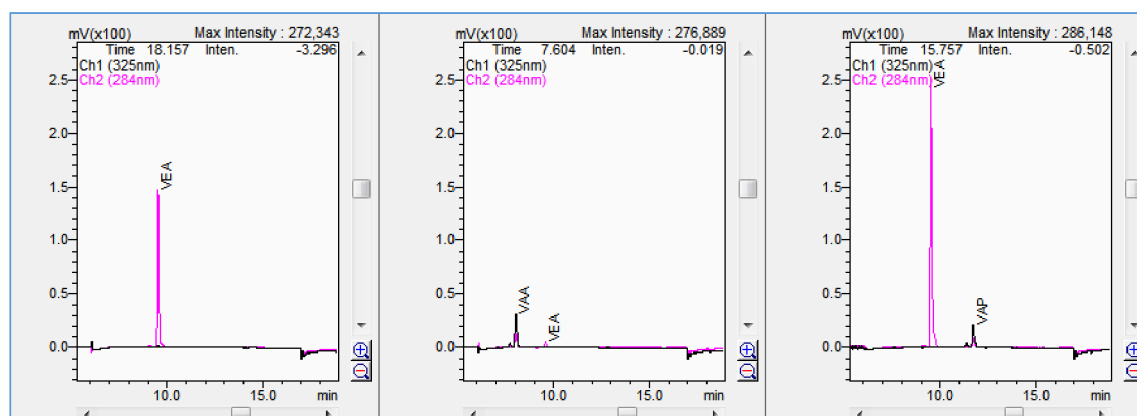


图7 脂溶性维生素类药品和保健食品Online SFE-SFC色谱图
(左: VE胶丸; 中: VA胶丸; 右: 多维片)

结论

本文使用岛津 Nexera UC Online SFE-SFC 系统建立了维生素 A 乙酸酯等五种脂溶性维生素分析方法,该方法实现样品前处理 (SFE) 和样品分析 (SFC) 在线联用,将原本需要多种前处理和分析手段才能分析的多种脂溶性维生素实现了同时分析。Online SFE-SFC 分析方式可以作为此类脂溶性维生素的快速检测手段,该方法可为食品药品生产、检验行业及部门提供参考。