

离线 SFE 萃取 SFC-MS 联用检测大蒜中的 9 种黄酮和酚酸类营养成分

SFC-010

摘要：本实验使用岛津 Nexera UC 离线 SFE 萃取 SFC-MS 联用建立了大蒜中阿魏酸等 9 种有效成分的检测方法。样品前处理简单，绿色环保且自动化程度高。萃取过程在封闭的萃取罐中进行，有效避免样品氧化和分解。使用 Shim-pack UC-X Diol 色谱柱，0.1 mM 草酸 1 mM 甲酸铵甲醇做改性剂，9 种目标物高效分离。0.02~4 μg 范围内基质匹配外标法建立校准曲线（阿魏酸和柚皮素在 0.01~4 μg ），线性范围宽，相关系数 R 大于 0.99，各标准点准确度在 91.2~110.5% 之间。在 0.4 μg 和 1 μg 加标量下考察萃取回收率和重复性，离线 SFE 萃取各组分定量结果的相对标准偏差在 5.5~13.2% 之间，回收率在 63.0~131.5%，可以满足定量分析的需求。本法用于市售多份大蒜、洋葱实际样品检测。

关键词：Nexera UC 离线 SFE SFC-MS 黄酮酚酸

大蒜为百合科葱属植物，是亚洲地区的主要调味品和保健品，具有较强的抗氧化、杀菌、抗衰老和抗动脉硬化功能。研究表明，含硫氨基酸、黄酮和多酚类化合物是大蒜中的重要功能成分，具有清除自由基，抗氧化的功效。但是这类物质不稳定，使用传统的溶剂萃取方式易发生分解。

超临界流体萃取 (Supercritical Fluid Extraction, SFE) 是以超临界流体和少量改性剂为萃取剂的新型高效萃取技术。超临界 $\text{CO}_2(\text{scCO}_2)$ 以其安全、价廉、无毒、易制得、化学惰性等因素成为 SFE 最常用的萃取剂。萃

取过程在封闭的腔体中进行，全程隔绝空气，特别适合易氧化组分的萃取。

SFC-MS 系统是岛津最新推出的超临界流体色谱质谱联用产品。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 分析具有快速、高效、高分离等优势。本实验使用离线 SFE 萃取，SFC-MS 联用系统检测大蒜中的黄酮和多酚类物质，该法前处理简单，自动化程度高，所需样品量少。本系统在大蒜产地鉴别以及地理标志产品领域具有广阔的应用前景。

实验部分

1.1 仪器

Nexera UC 离线 SFE 萃取 SFC-MS 联用系统，具体配置为：SFE-30A(超临界流体萃取单元)，SIL-30AC(自动进样器)，LC-30ADSF(CO_2 输液泵)，LC-20ADXR(输液泵，含 LPGU 低压梯度比例阀)，LC-20AD(补偿泵)，DGU-20A5 \times 2(在线脱气机)，CTO-20AC(柱温箱)，SFC-30A \times 2(背压调节单元)，CBM-20A(系统控制器)，LCMS-8040(三重四极杆质谱仪)配 ESI 电离源，LabSolutions Ver5.86(色谱工作站)。

1.2 样品信息

化合物信息见表 1。

标准溶液配制方法如下：分别取阿魏酸、香豆酸、柚皮素、芹菜素、原儿茶酸、异鼠李素、木犀草素、邻苯二甲酸和槲皮素 5 mg，用甲醇超声溶解定容至 10 mL，配制成单一标准溶液。上述 9 种单一标准溶液各取 400 μL ，甲醇定容至 5 mL 配制成 40 mg/L 混合标准溶液母液。再用甲醇稀释成 0.1、0.2、1、2、10、20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的混合工作溶液。

外标法制备基质匹配标准曲线，萃取罐制备方法如下：随机选取山东苍州大蒜 10 瓣，去皮压碎，并用研钵混匀。分别称取 6 份蒜泥于样品舟中，每份 0.5 g。分别加入 0.1、0.2、1、2、10、20、40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 混标溶液 100 μL 在蒜泥表面，然后向每份样品舟中加入 0.5 g 脱水剂，一次性药勺搅拌均匀后装入萃取罐进行 offline SFE 萃取。

洋葱、黑蒜、韭菜等实际样品测试 SFE 萃取罐制备方法如下：称取 0.5 g 均质后的市材与 0.5 g 脱水剂混匀装填至 5 mL 萃取罐中压紧。

表1 化合物信息

No.	名称	英文名	CAS#	分子式
1	阿魏酸	Ferulic Acid	1135-24-6	C ₁₀ H ₁₀ O ₄
2	香豆酸	Coumalic acid	500-05-0	C ₆ H ₄ O ₄
3	柚皮素	Naringenin	480-41-1	C ₁₅ H ₁₂ O ₅
4	芹菜素	Apigenin	520-36-5	C ₁₅ H ₁₀ O ₅
5	原儿茶酸	3,4-Dihydroxybenzoic acid	99-50-3	C ₇ H ₆ O ₄
6	异鼠李素	Isorhamnetin	480-19-3	C ₁₆ H ₁₂ O ₇
7	木犀草素	Luteolin	491-70-3	C ₁₅ H ₁₀ O ₆
8	邻苯二甲酸	Phthalic acid	88-99-3	C ₈ H ₆ O ₄
9	槲皮素	Quercetin	117-39-5	C ₁₅ H ₁₀ O ₇

1.3 分析条件

SFE 萃取条件

萃取剂: A-scCO₂; B-MeOH

萃取流速: 3 mL/min

静态萃取剂比例: A/B=70/30(v/v)

动态萃取剂比例: A/B=70/30(v/v)

萃取温度: 50°C

SFC 色谱条件

色谱柱: Shim-pack UC-X Diol(4.6 mm I.D.
×150 mm L., 3 μm)流动相: A-scCO₂; B-0.1 mM 草酸 1mM
甲酸铵 MeOH

柱温: 40°C

质谱条件

离子源: ESI-

雾化气流速: 3.0 L/min

接口电压: 4 kV

DL 温度: 230°C

静态萃取: 4 min*

动态萃取: 9 min

萃取背压: A-40 MPa;B-10 MPa

注: * 包括 1 分钟充填时间

背压: A-10MPa;B-40 MPa

补偿液: 甲醇

洗脱方式: 梯度洗脱: 30%B(0-2 min)-40%B
(3 min)-50%B(6-8 min)*

*8-12 min 为甲醇冲洗色谱柱

加热模块温度: 400°C

干燥气流速: 15.0 L/min

驻留时间: 9~24 ms

MRM 参数: 见表 2

表2 MRM参数

No.	名称	前体离子	产物离子	Q1 Pre Bias(V)	CE(V)	Q3 Pre Bias(V)
1	阿魏酸	193.10	134.10*	14	18	12
		193.10	178.00	14	15	17
2	香豆酸	163.00	119.10*	18	16	11
		163.00	91.00	12	29	16
3	柚皮素	271.10	151.00*	30	17	15
		271.10	119.10	30	24	11
4	芹菜素	269.10	117.10*	20	34	11
		269.10	151.00	20	24	14
5	原儿茶酸	153.10	109.10*	30	15	10
		153.10	91.00	30	26	30
6	异鼠李素	315.10	300.00*	23	21	13
		315.10	151.00	23	28	14
7	木犀草素	285.10	133.10*	21	32	12
		285.10	151.00	20	25	14
8	邻苯二甲酸	165.10	77.10*	12	16	10
		165.10	121.00	12	13	11
9	槲皮素	301.10	179.00*	22	17	17
		301.10	151.00	22	21	15

*表示定量离子

■ 结果与讨论

2.1 SFC-MS 色谱图

对阿魏酸等 9 种标准品进行 SFC-MS 分离条件优化。目标组分在硅胶柱上没有保留，0.5 min 之前所有组分出峰完毕。在 C18 柱上各组分出峰集中在 1~3 min，且异鼠李素峰形展宽。在氨基柱上邻苯二甲酸、原儿茶酸和木犀草素保留过强，不洗脱。在二醇基柱上各组分峰形尖锐，分离度好。因此最后选取 Shim-pack UC-X Diol 为分析柱。改性剂甲醇中加入 0.1 mM 草酸 1 mM 甲酸铵可消除酚酸的拖尾。另外，由于草酸在 scCO₂ 中溶解度低，时间程序中设置了 8~12 分钟为纯甲醇冲洗柱子，避免草酸析出导致柱压升高。优化后最佳的 SFC-MS 色谱图见图 1。

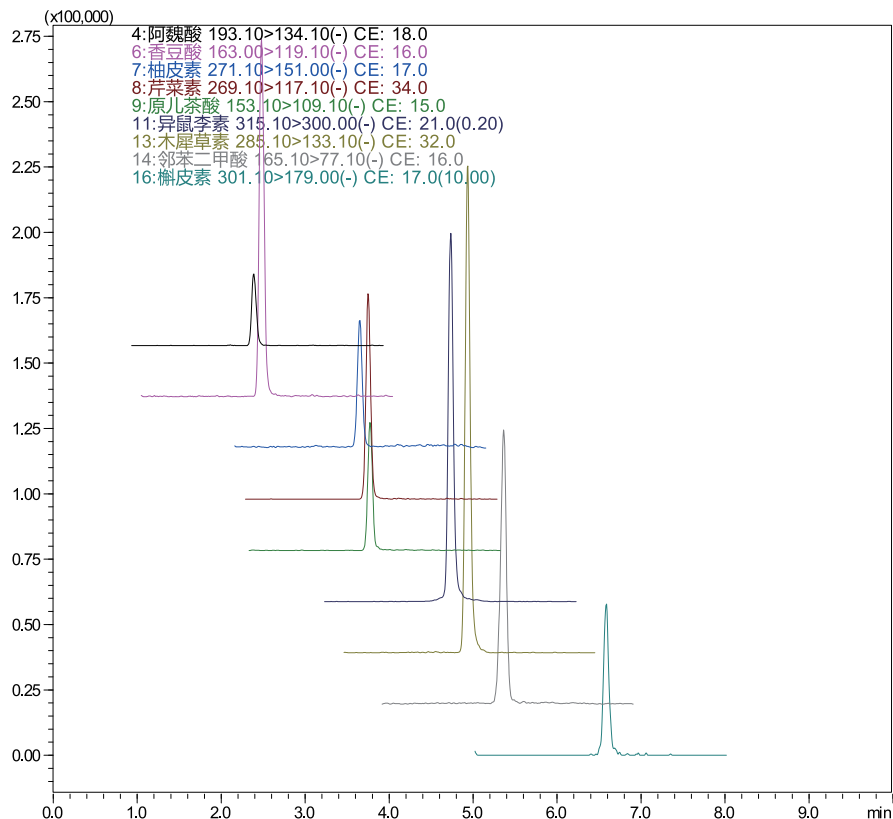


图1 SFC-MS标样检测色谱图(阿魏酸、香豆酸、柚皮素、芹菜素、原儿茶酸、异鼠李素、木犀草素、邻苯二甲酸和槲皮素浓度为100 ng/mL)

2.2 基质效应评价

大蒜中含有大蒜素、蒜氨酸和挥发油，可能会与目标组分共洗脱而产生基质效应。为了考察各组分的基质效应，分别用大蒜基质和甲醇配制以下系列工作溶液：

5、10、20、50、100、200、500 和 1000 ng/mL

得到两条工作曲线，用 C% 进行基质效应评价，计算公式如下：

$$C\% = (1 - S_s / S_m) \times 100$$

其中， S_s 为基质匹配工作曲线的斜率； S_m 为溶液标曲的斜率。当 $-50\% < C\% < 50\%$ 之间，则基质效应不明显。当 $C\% > 50\%$ 表现为强的基质抑制作用，当 $C\% < -50\%$ 表现为强的基质促进作用。实验结果见表 3，大蒜基质对 9 种目标组分均有较强的基质抑制作用。因此后续使用基质匹配外标法建立工作曲线。

表3 大蒜基质对9种目标组分基质效应考察

No.	名称	C%
1	阿魏酸	97.2
2	香豆酸	91.7
3	柚皮素	53.2
4	芹菜素	86.3
5	原儿茶酸	66.1
6	异鼠李素	89.0
7	木犀草素	68.5
8	邻苯二甲酸	54.8
9	槲皮素	56.6

2.3 线性范围

按照 1.2 所述标样萃取罐的制备方法制得 7 个萃取罐，按照 1.3 所述分析条件进行测定。以萃取罐中目标物的质量为横坐标，以目标峰面积为纵坐标，外标法制作工作曲线，各组线性回归方程及相关系数见表 4。实验结果表明各组分在考察范围内线性关系良好，线性相关系数 R 大于 0.99，各标准点准确度在 91.2~110.5% 之间。使用 LabSolutions 软件 ASTM 法计算最低标准样品的信噪比，由信噪比计算结果计算得到目标组分定量限 (LOQ, S/N=10) 在 0.001~0.02 之间。

表4 各组分标准曲线及相关系数

No.	名称	线性范围 (μg)	线性方程	相关系数	Accuracy (%)	LOQ(μg)
1	阿魏酸	0.01-4	$Y = 43016.5X - 191.094$	0.9943	94.4-104.9	0.003
2	香豆酸	0.02-4	$Y = 190429X + 4373.58$	0.9976	94.9-106.9	0.02
3	柚皮素	0.01-4	$Y = 181874X + 840.111$	0.9966	92.1-107.2	0.01
4	芹菜素	0.02-4	$Y = 121919X + 4672.02$	0.9946	93.6-109.9	0.02
5	原儿茶酸	0.02-4	$Y = 172508X + 6390.82$	0.9995	97.5-102.7	0.02
6	异鼠李素	0.02-4	$Y = 1164330X + 43451.2$	0.9996	91.6-110.3	0.001
7	木犀草素	0.02-4	$Y = 486205X + 51412.0$	0.9962	94.4-108.4	0.001
8	邻苯二甲酸	0.02-4	$Y = 168267X + 23429.8$	0.9933	91.2-110.5	0.02
9	槲皮素	0.02-4	$Y = 18925.4X - 107.708$	0.9993	93.0-104.1	0.02

2.4 重复性和回收率考察

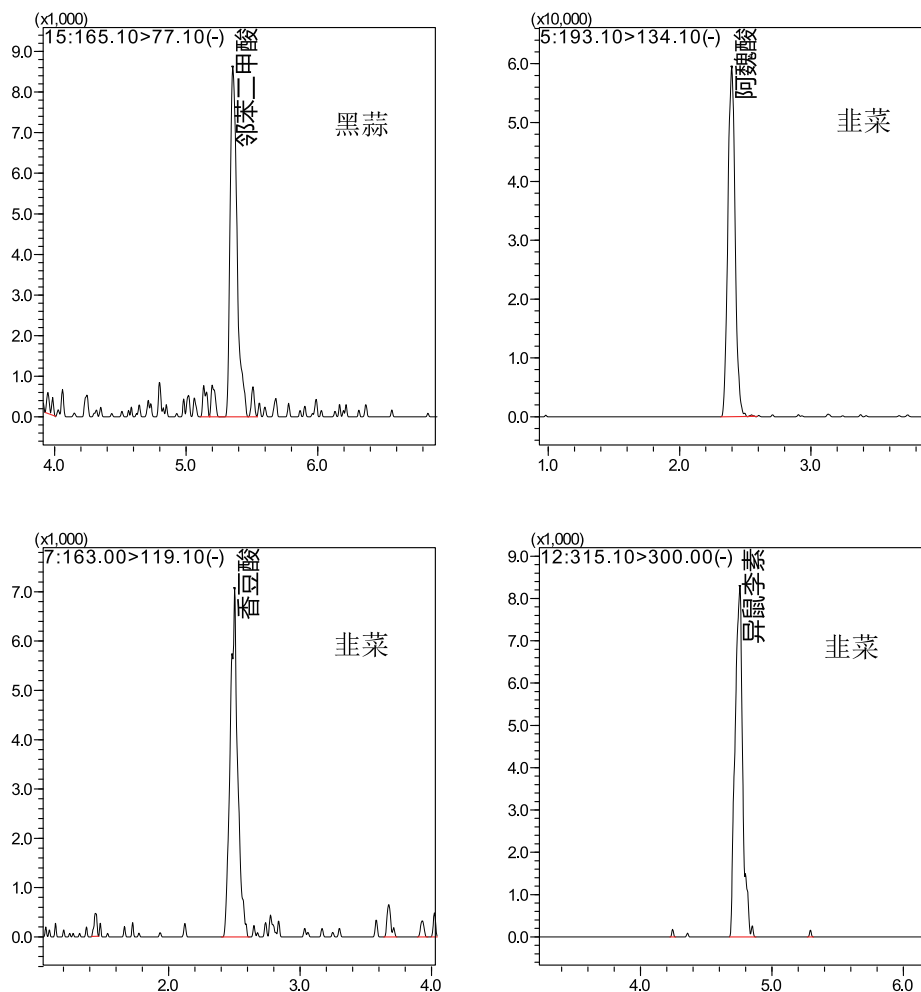
平行制备多个萃取罐，每个萃取罐中加入 0.5 g 蒜泥，在 0.4 μg 和 1 μg 加标量下考察萃取回收率和重复性，结果如表 5 所示。实验结果表明，离线 SFE 萃取各组分定量结果的相对标准偏差在 5.5~13.2% 之间，回收率在 63.0~131.5%，可以满足定量分析的需求。

表5 各组分的离线SFE萃取重复性考察结果(n=6)

No.	名称	样品测试值(μg)	0.4μg 加标结果			1μg 加标结果		
			加标样平均实测值(μg)	CV (%)	回收率(%)	加标样平均实测值(μg)	CV (%)	回收率(%)
1	阿魏酸	0.40	0.99	9.88	115.0-131.5	1.16	9.08	64.1-86.5
2	香豆酸	0.05	0.46	7.63	92.7-118.8	0.93	10.7	76.3-99.8
3	柚皮素	-	0.36	8.77	77.2-96.8	0.92	8.50	82.4-105.1
4	芹菜素	-	0.35	9.74	78.8-99	0.83	7.89	76.2-93.6
5	原儿茶酸	-	0.30	10.7	63.0-91.2	0.90	10.3	79.9-103.9
6	异鼠李素	0.06	0.38	5.50	70.8-84.8	0.89	10.4	72.4-94.1
7	木犀草素	-	0.32	6.73	74.0-88.5	0.82	9.8	75.4-94.7
8	邻苯二甲酸	-	0.36	9.84	77.8-100.2	0.89	10.6	75.2-101.6
9	槲皮素	-	0.27	13.2	66.6-76.5	0.93	11.7	79.7-110.4

2.5 实际样品检测

使用本文开发的方法对多份百合科葱属作物进行含量测定。样品中各目标组分的含量测定结果见表6，典型色谱图见图2。



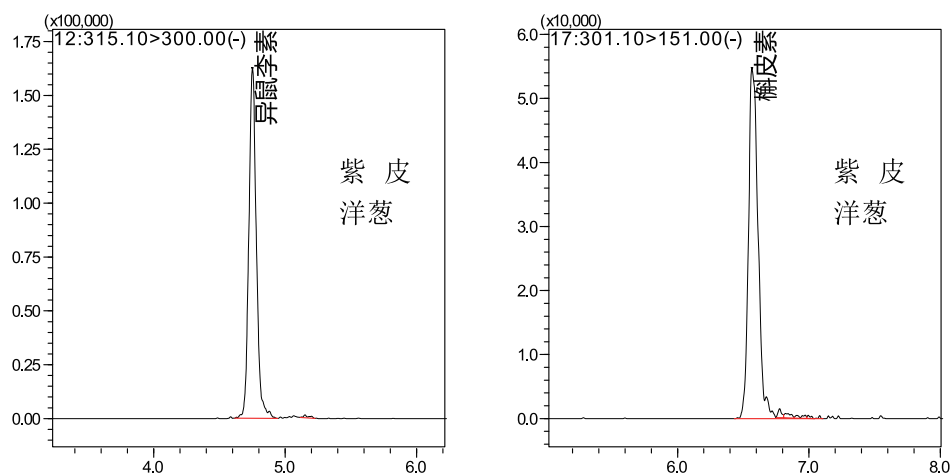


图2 实际样品检测色谱图

表6 实际样品中各组分含量测定结果($\mu\text{g/g}$, $n=2$)

No.	名称	黑蒜	韭菜	紫皮洋葱
1	阿魏酸	-	9.4	-
2	香豆酸	-	0.20	-
3	柚皮素	-	-	-
4	芹菜素	-	-	-
5	原儿茶酸	0.31	-	-
6	异鼠李素	-	0.11	1.02
7	木犀草素	-	-	-
8	邻苯二甲酸	0.14	-	-
9	槲皮素	-	-	25.6

结论

本文使用岛津 Nexera UC 离线 SFE 萃取 SFC-MS 联用检测大蒜中 9 种黄酮和酚酸类营养成分。该方法采用超临界流体萃取样品 (SFE) 简化了前处理操作, 具有快速、稳定、所需样品量少、绿色环保等优点。本系统在大蒜产地鉴别以及地理标志产品领域具有广阔的应用前景。