

合相色谱法鉴别香草提取物

Paula Hong, Michael Jones, and Patricia McConville

目的

相比于反相色谱法，本方法最大程度上简化了样品制备、降低了溶剂使用量并实现正交分离，是快速且灵敏的香草提取物筛选和鉴定分析方法。

背景

为降低香草提取的成本，一些制造商使用合成或人工香料替代更为昂贵的纯香草。在许多情况下，这些便宜的替代品包括合成成分，例如乙基香草醛。但某些提取物含有潜在危害性掺杂物，其中包括香豆素，即零陵香豆散发出的香味。这种特殊的掺杂物是一种可疑致癌物，可以与血液稀释药物发生反应。在美国，香豆素已被禁止用做食品成分，美国食品药品监督管理局(2009)针对近年来其在香草提取物中的滥用发出了消费者警告¹。

现已开发出大量的反相液相色谱(RPLC)方法用于分析，以确定香草提取物中的真实成分²⁻⁴。这些方法能够筛选出合成和人工香料，以及香草醛的次生成分，后者是香草豆荚正宗提取物的标志物。这些方法可实现高通量分析⁴，正交分离可依据不同的选择性带来便利。

UPC²® 技术针对香草醛的强极性、次生成分的保留性更强，从而能够对潜在危害性非极性掺杂物进行充分的保留和鉴定。

例如在反相分离中，某些香草醛次生化化合物(例如香草酸)的保留性很差，使得这些极性成分的分离很困难⁵。在合相色谱法中，各组分的洗脱性能相反，从而实现了强极化化合物更长的保留时间以及更好的分离度。

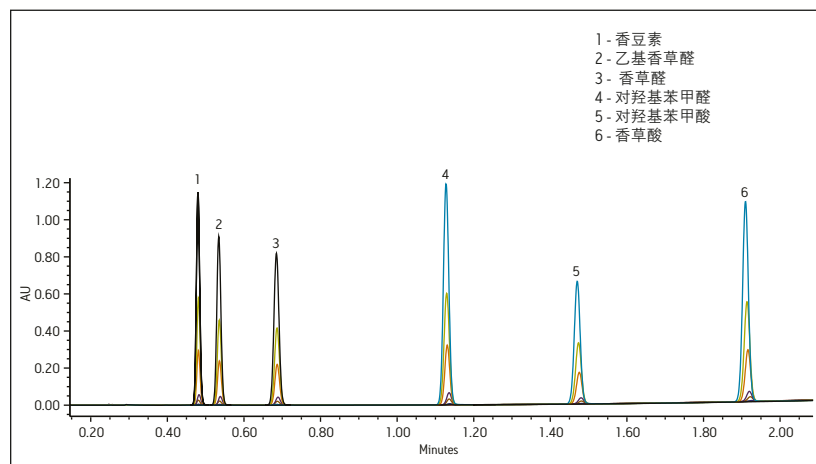


图1. 1.25-500 µg/mL浓度范围内线性校准标准品的叠加色谱图。各浓度水平溶液进样5次(n=5)。波长: 260 nm, 补偿。

解决方案

使用含有来自香草豆荚(香草醛, 对羟基苯甲酸, 对羟基苯甲醛和香草酸)的香味成分, 以及合成香草醛(乙基香草醛)和禁用掺杂物香豆素的标准溶液进行方法开发。标准溶液由异丙醇制备。实验采用ACQUITY UPC²™ BEH 2-EP 130Å 3.0 x 100 mm, 1.7 μm色谱柱开发出一个2.5 min的方法, 如图1所示。UV方法条件中使用了20 mM柠檬酸的甲醇溶液作为改性剂/添加剂, 用以改善酸性成分的峰形。

实验针对UV方法的重复性(表1)和线性(表2)进行了评估。配制0.250-500 μg/mL的标准溶液。在12.5 μg/mL浓度下, 保留时间的重复性($n=5$) $\leq 0.10\%$ RSD, 相同标准溶液进样的峰面积重复性为 $<1.80\%$ RSD。线性范围涵盖两至三个数量级, 与分析物相关, $R^2 > 0.999$ (表2)。被测分析物的定量限(LOQ)的范围在0.250至1.25 μg/mL之间。如果在分析香草提取物时需要稀释样品, 使用UV法可满足此特定分析的灵敏度要求。

为检测掺杂物, 将此方法用于筛选来自不同地理区域的香草提取物(包括标记为“纯品”和“仿制品”的样品)(图3)。使用乙醇对香草提取物进行十倍稀释(样品混溶), 并在分析前过滤。来自美国的香草提取物仿制品(A)的分析结果显示: 同时存在有合成香草醛(乙基香草醛)和香草醛。由于此样品中不存在其他的天然香料成分, 说明香草醛极有可能是合成的。在美国之外购得的已知香草提取物的伪造品(B)含有掺杂的香豆素以及香草醛, 由于不含次生香草成分, 因此也很可能来源于合成。最后, 标记为“纯品”的香草提取物(C)的分析结果确认其为真品。此样品中同时鉴定出了香草醛

化合物	峰保留时间的 % RSD	峰面积的% RSD
香豆素	0.093	1.78
乙基香草醛	0.10	0.45
香草醛	0.10	0.53
对羟基苯甲醛	0.074	0.26
对羟基苯甲酸	0.088	0.61
香草酸	0.070	0.66

表1. 香草提取物标准溶液(12.5 μg/mL)的重复性数据。进样次数 $n=5$ 。

化合物	R^2	线性范围
香豆素	0.999915	0.25 to 500 μg/mL
乙基香草醛	0.999970	1.25 to 500 μg/mL
香草醛	0.999961	1.25 to 500 μg/mL
对羟基苯甲醛	0.999970	0.25 to 500 μg/mL
对羟基苯甲酸	0.999882	1.25 to 500 μg/mL
香草酸	0.999954	1.25 to 500 μg/mL

表2. 采用UPC²方法所得的线性数据。

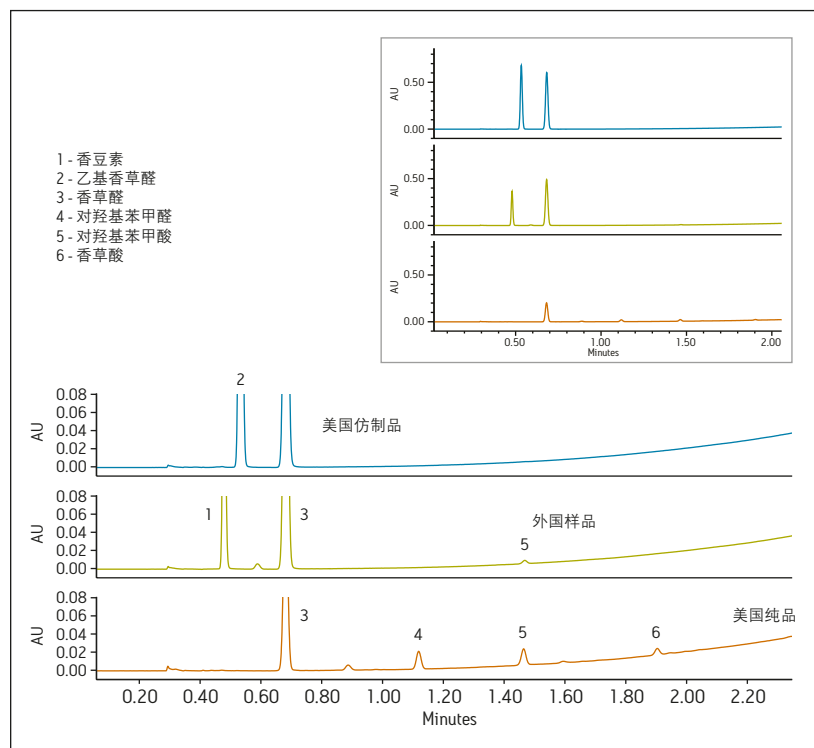


图2. 使用UPC²分析所得香草提取物的UV色谱图。样品采用乙醇稀释十倍。波长: 260 nm, 补偿。

提取物	纯品/ 人造品	国家	香豆素 含量	乙基香草醛 含量	香草醛 含量	含量 对羟基苯甲醛	含量 对羟基苯甲酸	香草酸 含量
A	人造品	USA	n/d	403.5 (0.41)	397.7 (0.41)	n/d	n/d	n/d
B	人造品	外国 样品	164.3 (0.70)	4.5 (0.63)	321.9 (0.50)	n/d	n/d	n/d
C	纯品	USA	n/d	n/d	136.0 (0.40)	9.0 (0.32)	14.5 (1.2)	3.7 (0.43)

表3. (10倍) 稀释市售香草提取物所测得的定量数据($\mu\text{g/mL}$)。重复进样5次。括号中为相对标准误差(%RSD)。

和次生天然香料成分，并进行了定量分析。此外，香草醛和对羟基苯甲醛的比值为14.9，位于纯正香草提取物之前的指示范围内(表3)²。

总结

Waters® ACQUITY UPC²系统采用CO₂流动相配合有机共溶剂和添加剂，可为RPLC提供正交选择性。对于香草提取物的分析，此项分离技术使香草醛的强极性、次生成分的保留性更强，并对非极性杂质进行充分的保留和鉴定。此外，相比于传统的RPLC法，此项色谱技术可提高效率、降低溶剂用量，同时是一种适用于分析香草提取物的高通量、灵敏的筛选方法。

参考文献

1. FDA. Some "Vanilla Extract" Produced in Mexico is No Bargain. Consumer Update. U.S. Food and Drug Administration Website; 2009.
2. Jenkins T, Waite M. Screening of Commercial Vanilla Extracts for Authenticity Using the Breeze 2 Modular HPLC System. Waters Application Note 720002877en. 2008 December.
3. Cicchetti E, Chaintreau A. Quantitation of the main constituents of vanilla by reverse phase HPLC and ultra-high-pressure-liquid-chromatography with UV detection: Method validation and performance comparison. *Journal of Separation Science*. 2009; 32(17):3043-3052.
4. Sharma UK, Sharma N, Sinha AK, Kumar N, Gupta AP. Ultrafast UPLC-ESI-MS and HPLC with monolithic column for determination of principal flavor compounds in vanilla pods. *J Sep Sci*. 2009; 32(20):3425-3431.
5. Lavine BK, Corona DT, Perera UDNT. Analysis of vanilla extract by reversed phase liquid chromatography using water rich mobile phases. *Microchemical Journal*. 2012; 103(0):49-61.

Waters

THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.®

Waters, UPC²和The Science of What's Possible是沃特世公司的注册商标。Ultra Performance Convergence Chromatography和ACQUITY UPC²是沃特世公司的商标。其他所有商标均归各自的拥有者所有。

©2013 沃特世公司 中国印制
2013年5月 720004701ZH TC-PDF

沃特世科技(上海)有限公司

北京: 010 - 5209 3866
上海: 021 - 6156 2666
广州: 020 - 2829 6555
成都: 028 - 6554 5999

沃特斯中国有限公司

香港: 852 - 2964 1800

免费售后服务热线: 800 (400) 820 2676
www.waters.com

