

## 在线 ASE-ASPEC-HPLC 自动检测麦芽中的前花色素

B. Zimmernmann, M. Papagiannopoulos, A. Mellenthin

M. Krappe, G. Maio, R. Galensa, Germany

(*G.I.T. Laboratory Journal* 04/2002, pp.175-177)

### 摘要

本文以麦芽中的前花色素 (proanthocyanidines) 为例, 描述了在线加速溶剂萃取 (ASE) 自动固相萃取 (ASPEC) 及高效液相色谱 (HPLC) 的应用。首先用 ASE 对固体麦芽样品进行萃取, 然后自动将萃取物转移到 ASPEC 固相萃取系统进行固相萃取纯化及浓缩, 最后直接将 ASPEC 处理好的样品进样于 HPLC 进行分析。从样品的萃取到给出色谱报告, 整个过程都是自动完成的。高通量的样品处理节省了时间及人力, 同时增加了检测灵敏度及重现性。本文描述了采用自动样品处理及分析的优点。

关键词: 萃取, ASE, PLE, SPE, ASPEC, 前花色素, anthocyanogenes, 多聚酚, 麦芽

在分析实验室中, 样品的前处理常常是费时、费力的工作。自动化能够减少人工介入, 同时可以增加样品处理的通量及增进分析的重现性。戴安公司生产的加速溶剂萃取仪 (ASE) 对于固体、糊状物的萃取, 提供了一个很好的解决方法[1-4]。在自动固相萃取系统中, 吉尔森的 ASPEC XLi 能够直接与色谱系统连接[5]。

图 1 展示了将现有的方法进行必要的改进后将 ASE、ASPEC XLi、HPLC 连接在一起的全自动系统。我们用麦芽中前花色素的分析证明了这套全自动样品处理及分析系统的好处。



图 1. 在线样品处理及分析系统仪器配置, 从左至右: ASE、ASPEC XLi、HPLC

前花色素 (proanthocyanidines) 属于多聚酚中的一大类。存在于水果、果汁、麦芽、啤酒及其它蔬菜食品的代谢物中。这些前花色素具有的存在既有利, 也有弊。例如, 在啤酒的生产及储存过程中, 前花色素与蛋白质共同影响浊度。然而, 其抗氧化剂的性质起到稳定香味及发泡的作用[6-8]。人们对多聚酚对健康的好处的讨论已经有一段时间了, 比如多聚酚作为绿茶及红酒的成份对人体健康的好处就是一个例子。目前生产中使用的分析方法一般仅仅测定总的参数。因为单项参数的分析太复杂、太费时。本文提供的方法包括了从固体样品的萃取、纯化浓缩到色谱定量分析每个化合物整个自动化过程。将 ASE、ASPEC XLi 及 HPLC 连接在一起, 大大降低了人工操作的程度, 同时也增加了样品处理的通量及分析检测的灵敏度和重现性。

## 仪器

### ASE—加速溶剂萃取

用 ASE200 (加速溶剂萃取仪, Dionex GmbH, Idstein, Germany) 进行加压液体萃取。ASE200 使用常用的溶剂在升高温度及压力下对固体及糊状物体进行萃取。在这种条件下, 能够增加溶剂对样品的渗透力, 同时有助于萃取的动力学过程, 从而减少萃取的时间。另外, 与传统的技术比较, 这种技术使用的溶剂也少。ASE200 可以连续处理 24 个样品, 因此可以与自动化的 ASPEC XLi 固相萃取及色谱系统连接起来使用。我们在建立方法的过程中, 优化了基于常规方法的不同的萃取条件。

### ASPEC—自动固相萃取

自动化固相萃取是通过吉尔森 ASPEC XLi (Gilson/Abimed\*) 完成的。该仪器将 ASE 萃取物转移到 1、3、或 6 mL 固相萃取柱上进行纯化及浓缩。该仪器还可以自动进行许多液体处理工作, 如稀释、混合、衍生化及添加内标物等等。在本试验中其混合功能尤为重要。如图 3 所示对 ASE 萃取物进行混合, 因为萃取物常常是不均匀的。固相萃取柱用专用的盖子密封, 只有一个小孔能够让移液针通过。这样就能够产生一个压力将液体压过固相萃取柱。这种方法与减压的方法不同, 能够有效、平稳地控制流速。残留在萃取柱里的液体通过空气压力全部通过萃取柱。ASPEC XLi 自动完成固相萃取过程: 对 SPE 萃取柱进行预处理、样品添加、柱子洗涤及馏分收集。馏份收集可以使用不同的溶剂分多步进行, 并且收集在不同的收集管中。这种 “multi-collect” 功能 (见图 2) 使我们能够使用不同的溶剂或收集不同的馏份。例如, 得到一个洗脱曲线。(\*Abimed 是吉尔森公司在德国总代理)

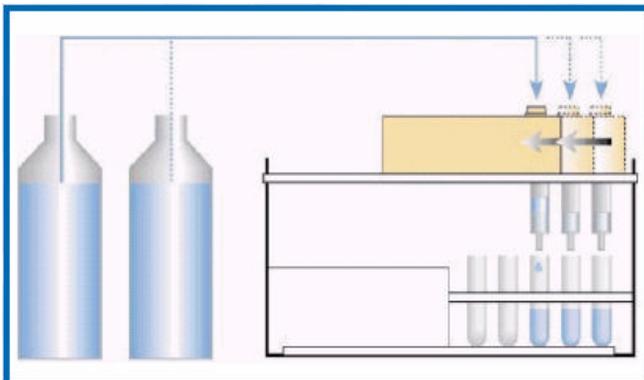


图 2. ASPEC XLi—自动固相萃取。

ASPEC 系统的多步收集功能将固相萃取中的分组收集简单化。

## 连接

为了尽可能地提高这套系统的通量, 系统中的每个部分同时进行工作: ASE200 进行萃取的同时, ASPEC XLi 进行 SPE 柱子预处理。一旦萃取完成, ASPEC XLi 将萃取物转移到固相萃取柱上 (图 3 所示)。当萃取物转移的工作完成后, ASE 接到信号进行下一个样品的萃取, 而 ASPEC XLi 则进行固相萃取步骤并将最后得到的洗脱物通过本身的进样阀打入 HPLC 柱。这时候, ASE 萃取的下一个样品已经处理完毕, 马上可以转入 ASPEC XLi 的固相萃取程序。

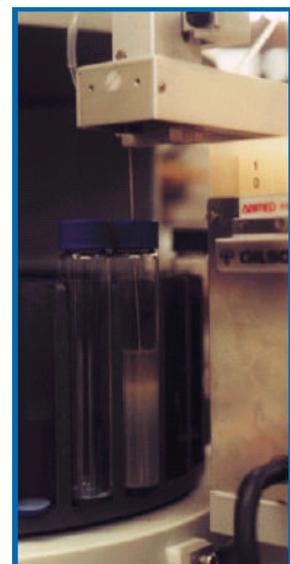


图3.连接—ASPEC XLi对ASE萃取物进行自动混合、转移。

## 检测麦芽中的前花色素

### 溶剂萃取

ASE 的萃取条件优化是基于图 5 的手工萃取方法[9]。将萃取的温度提高到 60 可以缩短萃取时间。ASE 萃取在 10 分钟之内就完成了, 而手工

的方法则要 2 小时。在使用相同体积的溶剂时，ASE 可以将样品的处理量由 1 克提高到 4 克，并且没有影响回收率。同时萃取物中分析物的浓度也增加了。传统的研磨麦芽方法得不同粒度的粉末，然后进行萃取。与传统的方法比较，ASE 对麦芽萃取的优势有明显的优势。当使用手工方法时，样品研磨的越细越好。而在样品可以很粗，因此不需要向手工操作时要求在液氮冷却的条件下进行研磨，这样操作起来就方便的多。

### 固相萃取

在进行加速溶剂萃取的过程中必须考虑使用对分析物溶解度大的溶剂。这种溶剂的存在对固相萃取是十分不利的。因为在固相萃取样品载样过程中要求将分析物吸附在萃取柱上。而这种溶剂会使分析物在载样步骤时就被洗脱流失。在 ASE 萃取的优化过程得到的萃取溶剂是 80% 的丙酮水溶液。这个溶度的丙酮对固相萃取来说是太高了。将 14mL 的萃取物用 24mL 水稀释后，丙酮的比例降低使之能够达到 98% 的回收率。这个结果证明，与传统的萃取方法不同，固相萃取时，样品中可以有部份有机溶剂。因此，在进行固相萃取前的样品浓缩步骤就可以省略。

洗脱步骤的优化是通过上述的多步收集“multi-collect”的功能完成的。85%DMF 水溶液是最佳的洗脱溶剂。我们分别收集 5 个 1 mL 的洗脱馏份，然后分别进行分析。图 4 显示馏份 2、3 含有全部可以被洗脱的前花色色素。优化结果证明可以减少洗脱剂的用量，这样可以增加分析物在馏份中的浓度。从而，可以不需要进一步浓缩就直接将样品注射到 HPLC 中。最后的结果是：简化了分析过程、节省了时间、减少了溶剂的消耗、得到更好的重现性。

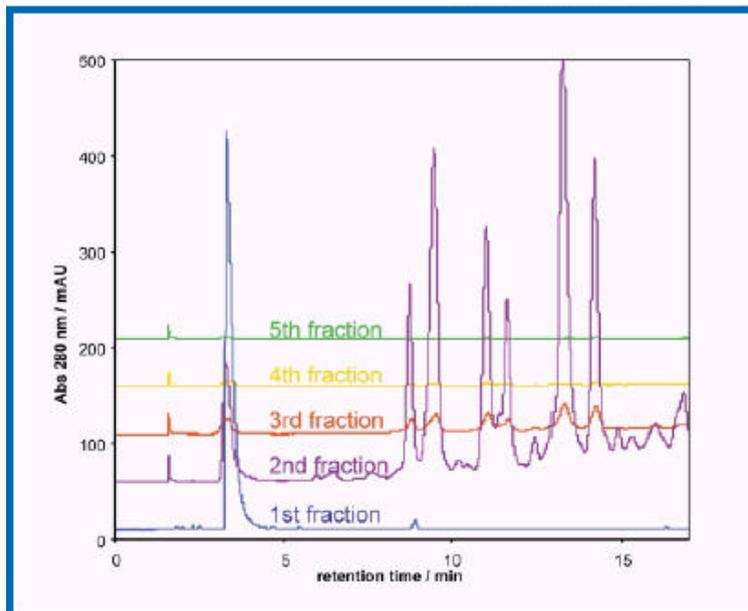


图 4. 利用 ASEPC XLi 的多组份收集功能优化固相萃取的洗脱条件。

### 手工方法与自动化方法的比较

比较手工方法及自动化的方法[9]，我们可以十分明显地看到自动化的优势。虽然两者得到的分析结果都一样，但自动化样品前处理及分析技术对每个样品所需的时间明显地减少。这样，自动化就增加了样品分析的通量。图 5 展示了两方法的比较：高效率的溶剂萃取(ASE)及固相萃取 (ASPEC XLi) 消除了蒸发浓缩步骤，节省了大量的时间。另外，自动化系统可以每天运行 22 小时，分析 20 个样品。而手工方法每天只能分析 8 个样品。与我们预期的一样，自动化的方法提高了结果的重现性，同时也提高了整个过程的分析灵敏度。整个样品处理及分析过程的缩短也减轻了分析人员的压力，从而也降低了人为错误的风险。

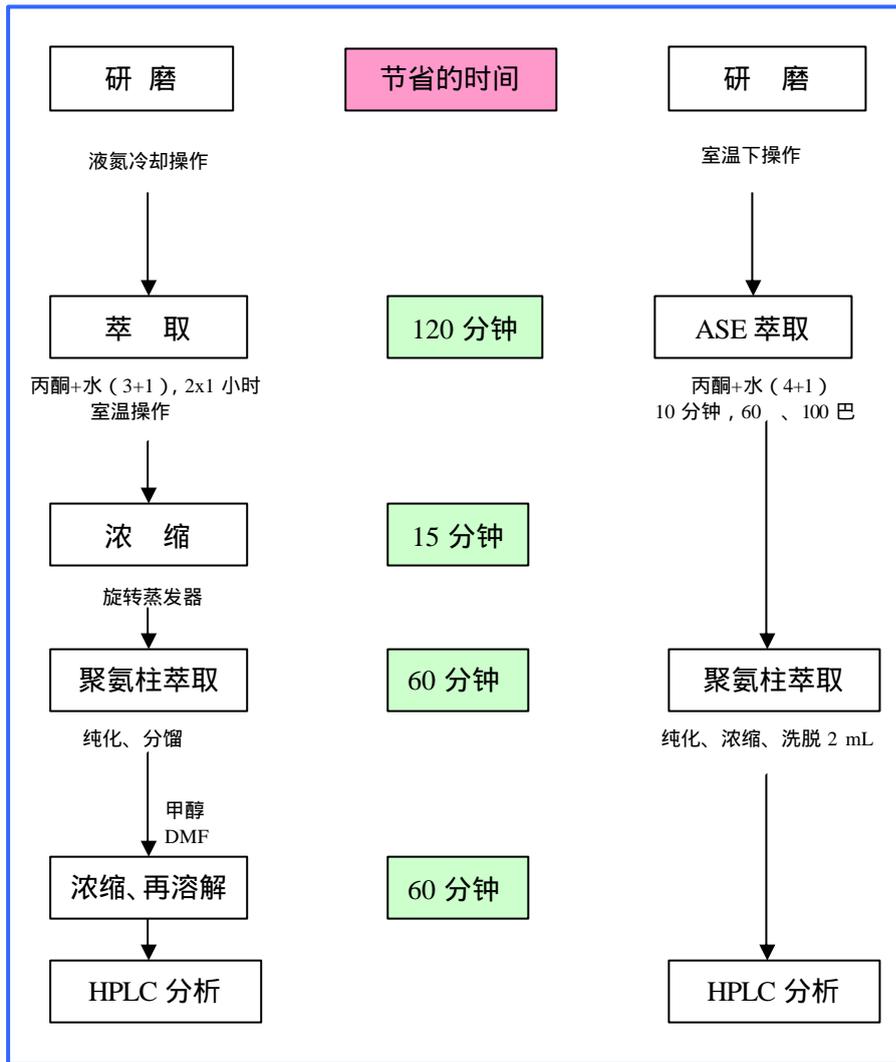


图 5. 手工方法及自动化方法在花费时间上的比较。

### 结论

对包括萃取、纯化及色谱全过程在内的固体样品全自动前处理及分析的研究证明能够提高实验室的工作效率。特别是在人工介入较多的样品处理过程中，不但要求操作人员的实验素质较高，而且十分花时间。而自动化使得这一切都变得简单了。这项研究初期投入的人力及时间较高，但实验证明这套系统能够增加样品的通量，增进分析结果，并且能够很好地控制整个分析过程。

### 文献

1. H?fler, F.: Beschleunigte L?semittel-extraktion, 1. Aufl. Dionex GmbH, Idstein, 2000
2. Fisher, J. A., Scarlett, M.J., Stott, A. D.: Accelerated Solvent Extraction: An Evaluation for Screening of Soils for Selected U.S. EPA Semivolatile Organic Priority Pollutants, Environmental Science and Technology 31, 1120-1127 (1997)
3. Wenzel, K.-D., et al.: Accelerated Solvent Extraction of Semivolatile Organic Compounds form Biomonitoring Samples of Pine Needles and Mosses, Anal. Chem. 70, 4827-4835 (1998)

4. David, M. D., Campell, S., Li, Q. X: Pressurized Fluid Extraction on Nonpolar Pesticides and Polar Herbicides Using In Situ derivatization, Anal. Chem. 72, 3665-3670 (2000)
5. Krappe, M.: Automatisierte Festphasenextraktion als Probenvorbereitung für die fruchtsaft-analytik, flüssiges Obst 12/99 699-701 (1999)
6. McMurrugh, I., Madigan, D., Kelly, R. J.: The Role of Flavanoid Polyphenols in Beer stability, J. Am. Soc. Brew. Chem. 54(3) 141-148 (1996)
7. Wackerbauer, K., Anger, H.- M.: Bierstabilisierung unter besonderer Berücksichtigung der polyphenole, Monatsschrift für Brauwissenschaft 4/84 153-161 (1984)
8. Gromus, J., Lustig, S.: Einfluß von Polyphenolen und reduzierenden Verbindungen auf die Bierqualität und ihr Verhalten im Brauprozess, Brauwelt 44 2028-2034 (1999)
9. Friedrich, W., Eberhardt, A., Galens, R.: investigations of proanthocyanidins by HPLC with electrospray ionization mass spectrometry, European Food Research and technology 211 56-64 (2000)

