

# 在线超临界流体萃取-超高效液相色谱-光电二极管 检测器联用分析胡椒粉中的胡椒碱

Takayuki YAMAGUCHI, Kazutoshi KAMEZAWA, Keijin IWAYA, Yasuyo SATO,

Toshihiko MIYAJI, Masao BOUNOSHITA, David J TOGNARELLI, Muneo SAITO

**摘要** 本文介绍的联用分析系统是将超临界流体萃取(SFE)系统与超高效液相色谱(UHPLC)系统联用。使用在线SFE-UHPLC系统,可以完成对胡椒粉中胡椒碱成分的高速萃取和分析。整个分析过程包括萃取时间在內只需要7 min。将此方法的萃取回收率与其他萃取方法进行比较, SFE方法得到的回收率与其他方法相当。这种在线SFE-UHPLC方法操作简单,分析速度快。这一方法对于分析固体样品中的化合物组分非常有用,可以有效避免繁琐的样品预处理过程。

超高效液相色谱(UHPLC)是一种分离分析技术,其使用的色谱柱是填充微型颗粒(直径 $< 2 \mu\text{m}$ ),由Xtreme liquid chromatography (X-LC™)系统(JASCO Corp., Tokyo, Japan)提供。UHPLC凭借其更高的分离效率和对溶剂的低消耗量而得到广泛使用。UHPLC的分离时间只是常规液相色谱方法的1/10。然而,UHPLC的部件必须制造精密以防止窄色谱峰的峰扩散问题。

目前对于固体样品有多种萃取方法,比如经典的溶剂萃取以及索氏萃取法等<sup>[1,2]</sup>。然而,这些手段需要繁琐的萃取步骤和冗长的萃取时间,从而引起操作误差。超临界流体萃取(SFE)可以提供快速、有效以及环境友好的萃取方式从而成为一种新的萃取方法。以上优势是由于在超临界流体当中,传质速率要比液相萃取高很多。二氧化碳,这种通常用于超临界萃取的流体,具有 $T_c=31.1 \text{ }^\circ\text{C}$ 和 $P_c=7.38 \text{ MPa}$ 这样温和的临界参数,而且低毒、廉价。

分析系统中多种方法的联用具有很多优势,比如减少分析时间、降低分析成本、样品预处理简单化以及灵敏度和选择性提高等。1985年, Sugiyama和他的同事报道了SFE和超临界流体色谱(SFC)的直接联用,实现了对咖啡豆中咖啡因的联用分析<sup>[3]</sup>。1987年, Hawthorne和Miller使用SFE-GC(气相色谱)联用的方法分析了环境固体中的多环烃和聚氯联苯<sup>[4]</sup>。2003年, Ashraf-Khorassani和他的同事使用在线SFE-

LC(液相色谱)方法测定了聚合物添加剂<sup>[5]</sup>。然而, SFE和UHPLC联用对固体样品的分析还没有被报道过。

这个在线SFE-UHPLC系统(JASCO)使用了阀切换技术。固体样品中我们感兴趣的组分在SFE中进行有效萃取后引入UHPLC系统来完成快速分离和高灵敏度检测。该系统无需繁琐的样品预处理,能够提供快速和高灵敏的分析。

胡椒粉常被用作一种调味料。胡椒粉中的主要有效成分胡椒碱,是一种具有刺激和辛辣味道的生物碱。1988年, Takaji和他的同事研究了使用SFE方法从通过 $\gamma$ 射线处理过的整个胡椒籽当中萃取胡椒碱的萃取效率<sup>[6]</sup>。据报道,胡椒碱具有多种药理学特性<sup>[7-10]</sup>。自从胡椒碱被广泛认为是胡椒粉辛辣味道的重要组分,建立一种快速简便的分析方法变得非常重要。

## 1 实验部分

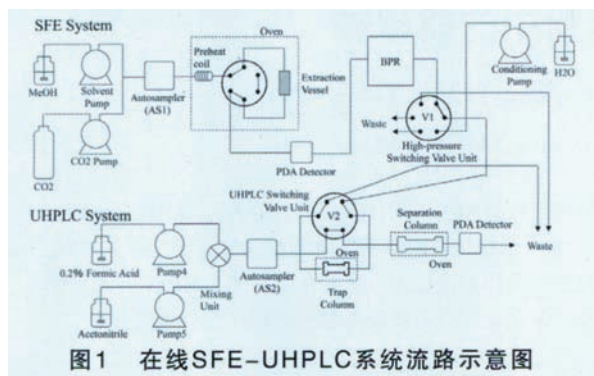
### 1.1 仪器

SFE-UHPLC联用系统由一个SFE系统和一个UHPLC系统(均为JASCO)组成。图1为整个在线SFE-UHPLC系统的流路图。胡椒碱溶液通过自动进样器(AS1)流入,而胡椒粉样品则置于萃取容器中。样品中的目标化合物在特定的萃取条件下进行萃取,然后在与高压切换阀相连的捕集柱上进行捕集和浓缩。萃取之后,萃取液通过一个特定的泵在捕集柱

### 作者简介

Mr. Yamaguchi, Mr. Kamezawa, Mr. Iwaya, Ms. Sato, Mr. Miyaji, Mr. Bounoshita, and Dr. Saito are with JASCO Corp., 2967-5 Ishikawa-machi Hachiozi-shi Tokyo 192-8537, Japan; tel.: +81 42 646 4111; e-mail: muneo.saito@jasco.co.jp. Mr. Tognarelli is with JASCO Inc., Easton, MD, U.S.A. This paper was presented in part as 2775-1P at Pitcon 2010, Orlando, FL, U.S.A. 该文已获得American Laboratory/Labcompare再版许可。

上去除气态的二氧化碳。然后,通过UHPLC的阀切换(V2),捕集柱与分离柱相连,捕集到的化合物在UHPLC系统的分离柱上实现分离。



## 1.2 药品

二氧化碳(99.99%)购自Nippon Tansan, Co., Ltd. (Tokyo, Japan)。乙腈和甲醇购自Wako Pure Chemicals (Osaka, Japan),用作流动相(HPLC级)。胡椒碱(Wako Pure Chemicals)的甲醇溶液作为标准溶液,质量浓度为0.1 mg/mL。超纯水通过一个Milli-Q水纯化系统(Millipore, Bedford, MA)得到。样品包括细颗粒黑胡椒粉和白胡椒粉。细颗粒黑胡椒粉和白胡椒粉购自食品店,产自S&B食品(Tokyo, Japan)。

## 1.3 萃取样品的准备

进行SFE的胡椒粉样品通过以下步骤进行处理:

- 1)胡椒粉与二水合硫酸钙混合(1:999)(稀释样品中的胡椒粉浓度以便于萃取);
- 2) 10 mg样品置入萃取容器中;
- 3)不锈钢杆插入容器中并使样品粉末沉积在容器底部;
- 4)关闭萃取容器的盖子。

## 2 结果与讨论

### 2.1 SFE中温度和压强的影响

萃取效率通常随温度和压强变化<sup>[11]</sup>。通过改变萃取温度40~60 °C以及萃取压强10,15,20,25,30 MPa考察了两种参数对萃取效率的影响。在上述条件下,结果非常相似。在恒定压强下,随着超临界二氧化碳温度的增加,其密度和溶剂化能力降低。在恒定温度下,随着压强的升高,超临界二氧化碳的密度增加,并具有更高的溶剂化能力。因此,在本研究中,设定萃取温度为40 °C,萃取压强为30 MPa。

### 2.2 捕集柱性能的差异

1. 柱填料。捕集柱上对胡椒碱溶液(0.1 mg/mL,进样1.0 μL)捕集效率的考察通过以下两种不同规格的捕集柱进行:一根EV-C18筒状填充柱(OES-C18)和一根EV-PS筒状填充柱(聚苯乙烯-二乙烯基苯共聚

物)(以上柱均购自JASCO)。图2比较了胡椒碱在以上两个捕集柱上的色谱图以及各自的峰面积。可以看到,在EV-PS柱上得到的理论塔板数(NTP)和峰拖尾因子比在EV-C18柱上得到的要好一些。在EV-C18捕集柱中,其保留主要为C18烷基链的疏水相互作用,而在EV-PS捕集柱中,其保留作用主要为胡椒碱和填充材料的苯基 $\pi-\pi$ 相互作用。EV-PS的柱容量也高于EV-C18,这是由于EV-PS柱的活性作用部位在材料本身,而EV-C18的活性部分在多孔硅胶颗粒表面的化学键合基团上。因此,选择EV-PS柱用于后续样品分析。

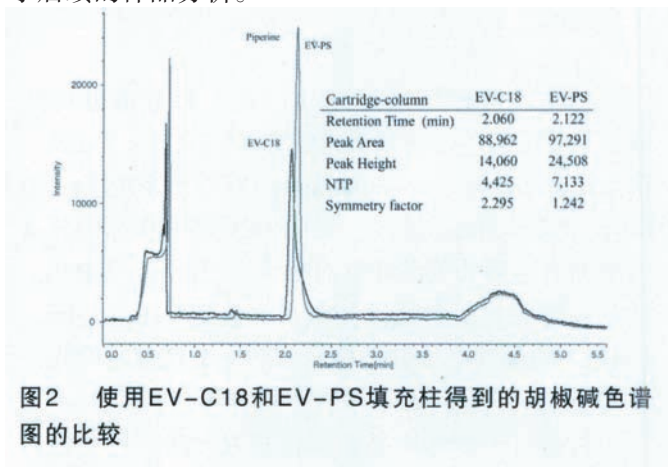


图2 使用EV-C18和EV-PS填充柱得到的胡椒碱色谱图的比较

2. 柱长。考察了改变捕集柱的柱长对捕集效率的影响。表1显示了通过改变捕集柱的柱长得到的胡椒碱峰参数。使用5-mm长捕集柱得到峰的NTP和拖尾因子明显好于其他柱长条件,然而,其峰面积却比其他条件的捕集柱小。这说明,5-mm长的捕集柱并不能完全捕集洗脱液中的有效化合物组分,而柱长10-mm以上的捕集柱所得到的峰面积几乎没有变化。在以上柱条件中,20-mm长的捕集柱可以获得最好的NTP和拖尾因子,因此作者采用20-mm长的捕集柱。

表1 胡椒碱峰参数的比较

柱长(mm)	$t_R$ (min)	NTP	拖尾因子	峰面积( $\mu V \cdot s$ )
5	1.76	8532	1.25	2543786
10	2.01	8078	1.15	4058696
15	2.14	8059	1.15	4042062
20	2.14	9229	1.14	4051648

3. 峰面积和保留时间的重现性。峰面积和保留时间的重现性通过5次连续进样的结果进行计算。保留时间和峰面积的相对标准偏差(RSD)分别为0.36%和1.91% ( $n=5$ )。

4. 回收率。胡椒碱的回收率通过UHPLC系统和

SFE-UHPLC在线联用系统当中的峰面积进行计算。得到的回收率为96.0%。

5. 分馏时间的优化。黑胡椒粉末萃取中的SFE截面使用一台X-LC 3110MD光电二极管阵列(PDA)检测器(JASCO)进行检测来优化分流时间。胡椒粉萃取在0.3 min内完成, 比经典的溶剂萃取时间要短。在0.0~0.5 min内进行分馏操作。将胡椒粉萃取液的光谱与胡椒碱的光谱进行比较。两个光谱的相关性系数为0.8265, 证明黑胡椒提取物中含有胡椒碱。

6. 对黑胡椒粉和白胡椒粉中胡椒碱的分析。图3为黑胡椒粉的SFE萃取产物及其UHPLC色谱图。在黑胡椒粉中胡椒碱的峰通过保留时间进行鉴定。图3同时描述了胡椒碱标准品和在黑胡椒粉中提取出的胡椒碱的光谱。这两个光谱匹配的非常好, 相关系数为1.0000。这一结果证明胡椒粉当中的胡椒碱可以有效地被萃取出来并在很短的时间内在UHPLC上得到完全的分离。通过胡椒碱标准溶液和黑胡椒当中胡椒碱两者的色谱图进行计算, 得到胡椒碱在黑胡椒粉当中的含量为55.6 mg/g。分析黑胡椒的重现性为4.53% ( $n=5$ )。白胡椒粉的分析也使用相似的方法进行。测得白胡椒粉当中的胡椒碱含量为34.6 mg/g。分析白胡椒的重现性为3.73% ( $n=5$ )。

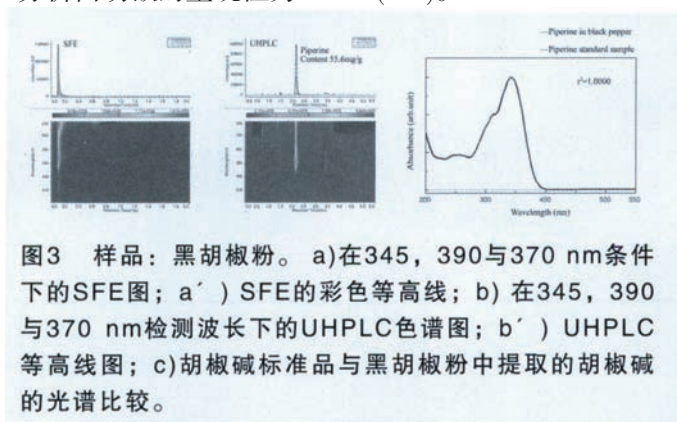


图3 样品: 黑胡椒粉。a) 在345, 390与370 nm条件下的SFE图; a') SFE的彩色等高线; b) 在345, 390与370 nm检测波长下的UHPLC色谱图; b') UHPLC等高线图; c) 胡椒碱标准品与黑胡椒粉中提取的胡椒碱的光谱比较。

7. 萃取方法效率的比较。为比较不同萃取方法效率的差异, 尝试了3种不同的萃取技术: 简单溶剂萃取、索氏萃取以及在线SFE-UHPLC联用(见表2)。其中在线SFE-UHPLC方法操作简单, 样品预处理时间非常短。

8. 胡椒碱回收率的比较。表3列出了使用3种不同萃取方法从黑胡椒粉和白胡椒粉当中提取胡椒碱的回收率。通过以上3种方法得到的胡椒碱的量几乎相同。这说明通过SFE方法提取胡椒碱可以得到很好的回收率。

表2 三种萃取方法的处理步骤

溶剂萃取	索氏萃取	SFE
1) 研磨胡椒粉(0.5 g)	1) 研磨胡椒粉(0.5 g)	1) 研磨胡椒粉(0.05 g)
2) 溶于100 mL甲醇	2) 用二氯甲烷萃取20 h	2) 与二水合硫酸钙混合
3) 超声提取10 min	3) 加热到60 °C, 真空蒸馏	3) 将混合粉末放入提取器中
4) 通过滤膜(0.2 μm)进行过滤	4) 在提取器内进行回流	4) 在线SFE-UHPLC检测
5) UHPLC检测	4) 溶于100 mL甲醇	总时间: 0.25 h
总时间: 1 h	5) 通过滤膜(0.2 μm)进行过滤	
	6) UHPLC检测	
	总时间: 22 h	

表3 通过三种萃取方法得到的黑胡椒粉和白胡椒粉中胡椒碱的含量和回收率

提取方法	样品: 黑胡椒			样品: 白胡椒		
	胡椒碱/胡椒粉(mg/g)	回收率* (%)	RSD (%) (n=5)	胡椒碱/胡椒粉(mg/g)	回收率* (%)	RSD (%) (n=5)
溶液萃取	54.9	100.0		35.4	100.0	
索氏萃取	52.7	96.0		35.2	99.4	
SFE	56.6	103.0	4.53	34.6	98.3	3.73

### 3 结论

通过UHPLC方法可以在1.7 min内完成对胡椒碱的分析, 比常规的HPLC方法(7.7 min)快4倍。X-LC UHPLC系统与SFE系统的联用通过阀切换技术成功实现。含有胡椒碱的提取物在SFE系统内用一根填充有苯乙烯-二乙烯基苯共聚物的EV-PS填充柱实现捕集。所用UHPLC系统具有很好的重现性(保留时间的RSD为0.36%、峰面积的RSD为1.91%)。总的回收率为96.0%。胡椒碱标准样品和胡椒粉提取物的光谱均由X-LC 3110MD PDA进行测定, 得到很好的匹配。黑胡椒中胡椒碱的含量为55.6 mg/g, 白胡椒中胡椒碱的含量为34.6 mg/g。对3种不同提取方法获得胡椒碱的量进行了比较, 具有很好的一致性。这种在线SFE-UHPLC方法简单并且可以实现快速分析。这一方法对于分析固体样品中的化合物组分非常有用, 可以有效避免繁琐的样品预处理和样品转移过程。

### 参考文献:

- [1] Hawthorne S B. Anal Chem, 1980, 62: 271.
- [2] King J W, France J E. In Analysis with Supercritical Fluids: Extraction and Chromatography, Wenclawiak B, Ed. Springer: Berlin, 1992: 32.

- [3] Sugiyama K, Saito M, Honda T, Senda M. *J Chromatogr*, 1985, 332: 107.
- [4] Hawthorne S B, Miller D J. *J Chromatogr*, 1987, 403: 63.
- [5] Ashraf-Khorassani M, Nazem N, Taylor L T. *J Chromatogr A*, 2003, 995: 227.
- [6] Takagi K, Okuyama T, Yamauchi Y, Saito M. *Shokuhin Shosha*, 1988, 23(2): 46.
- [7] Bajad S, Bedi K L, Singla A K, Johri R K. *Planta Med*, 2001, 67: 176.
- [8] Bajad S, Bedi K L, Singla A K, Johri R K. *Planta Med*, 2001, 67: 284.
- [9] Zhixiu L, Hoult J R S, Bennett D C, Raman A. *Planta Med*, 1999, 65: 600.
- [10] Capasso R, Izzo A A, Borrelli F, Russo A, Sautebin L, Pinto A, Capasso F, Mascolo N. *Life Sciences*, 2002, 71: 2311.
- [11] Wang Z, Ashraf-Khorassani M, Taylor L T. *J Chromatogr A*, 2004, 1033: 221.

## Analysis of Piperine in Peppers Using On-Line SFE-UHPLC With Photodiode Array Detection

Takayuki YAMAGUCHI, Kazutoshi KAMEZAWA,

Keijin IWAYA, Yasuyo SATO, Toshihiko MIYAJI,

Masao BOUNOSHITA, David J. TOGNARELLI, and Muneo SAITO

The hyphenated system described in this article couples a supercritical fluid extraction (SFE) system with an ultra-high-performance liquid chromatography (UHPLC) system. High-speed extraction and the analysis of piperine in pepper powder are demonstrated using an on-line SFE-UHPLC system. The analysis, including the extraction process, was performed in 7.0 min. The extraction recovery was compared with other extraction methods, and the SFE method gave comparable results. The on-line SFE-UHPLC method is very simple and achieves high-speed analysis. The method will be very useful for analyzing the compounds in solid samples without any complicated pretreatment.

### 新闻动态

#### 安捷伦推出业界最佳准确度的猪肉中“瘦肉精”残留检测方法

随着“瘦肉精”猪肉事件的再次曝光，国家各部门立即派出督察组督导查处工作。安捷伦作为分析仪器行业的领导者，食品分析者的最佳合作伙伴，对该事件立即做出反应，推出了具有最佳准确度的猪肉中“瘦肉精”超痕量分析的解决方案。瘦肉精是动物用药，包括盐酸克仑特罗、莱克多巴胺、沙丁胺醇和硫酸特布他林等，属于肾上腺类神经兴奋剂。食用含有“瘦肉精”的肉会对人体产生危害，因此，国内外对该类化合物的限量要求也越来越严。安捷伦推出的猪肉中“瘦肉精”检测方法特别针对于新法规的超低检测限要求而开发，凭借安捷伦LC/MSMS的无与伦比的灵敏度，实现了对猪肉中的瘦肉精超痕量残留的准确定量、定性分析（检测下限可达50 ppt，不同添加浓度下的重复实验，平均RSD为4.4%），结合安捷伦最新的SCX聚合样品前处理技术，平均回收率接近90%。该方法准确，简单便捷，检测灵敏度高，可称之为当前具有最佳准确度的猪肉中瘦肉精检测方法。