

应用纪要

利用UPLC-FLR法测量可可类商品中的黄烷醇和原花青素生物活性物质

Ugo Bussy, Jinchuan Yang, Hong You, Nicholas Anderson, Emily R Britton, Catherine Kwik-Urbe

Mars, Incorporated, Waters Corporation, Eurofins US Food and Nutritional Supplements



摘要

近年来，结合荧光检测的亲水作用液相色谱(HILIC)方法被视为可可黄烷醇和原花青素（聚合度1~7）的官方分析方法(AOAC2020.05)。本应用纪要展示了AOAC2020.05在与ACQUITY UPLC FLR检测器联用的Waters ACQUITY UPLC H-Class系统（使用Waters Torus DIOL色谱柱和Waters Oasis PRiME MCX SPE小柱）上的成功应用。着重强调了充分完成系统平衡和样品净化的优势。该方法成功分析了市售的可可类食品和膳食补充剂（可可黄烷醇和原花青素含量范围为3~500 mg/g），证明使用沃特世仪器和色谱柱对这些产品中的黄烷醇和原花青素进行常规分析的通用性和可靠性。

优势

- Waters ACQUITY UPLC H-Class系统和ACQUITY UPLC FLR检测器为可可类食品和膳食补充剂中黄烷醇和原花青素的常规分析提供了理想平台
- Waters Torus DIOL色谱柱使可可黄烷醇和原花青素实现了优异且可靠的分离
- Waters OASIS PRiME MCX SPE小柱可有效去除基质杂质，确保可重现地测定可可黄烷醇和原花青素

简介

可可黄烷醇和原花青素(F/PC)是植物性生物活性物质，有研究证明可支持健康的血液流动，对心血管和认知有益^{1,2}。在可可中，黄烷醇由可能存在的四种单体（(+/-)-表儿茶素和(+/-)-儿茶素）代表，而原花青素是由这些单体形成的低聚物（图1）³。鉴于这些化合物具有结构相似性并且可能存在多样的原花青素结构，可通过聚合度(DP)进行定义、分离和测量⁴⁻⁶。由于低聚物结构异质性随聚合度的增加呈指数增长，因此开发稳定可靠的定量分析方法一直是科学界面临的一大挑战。

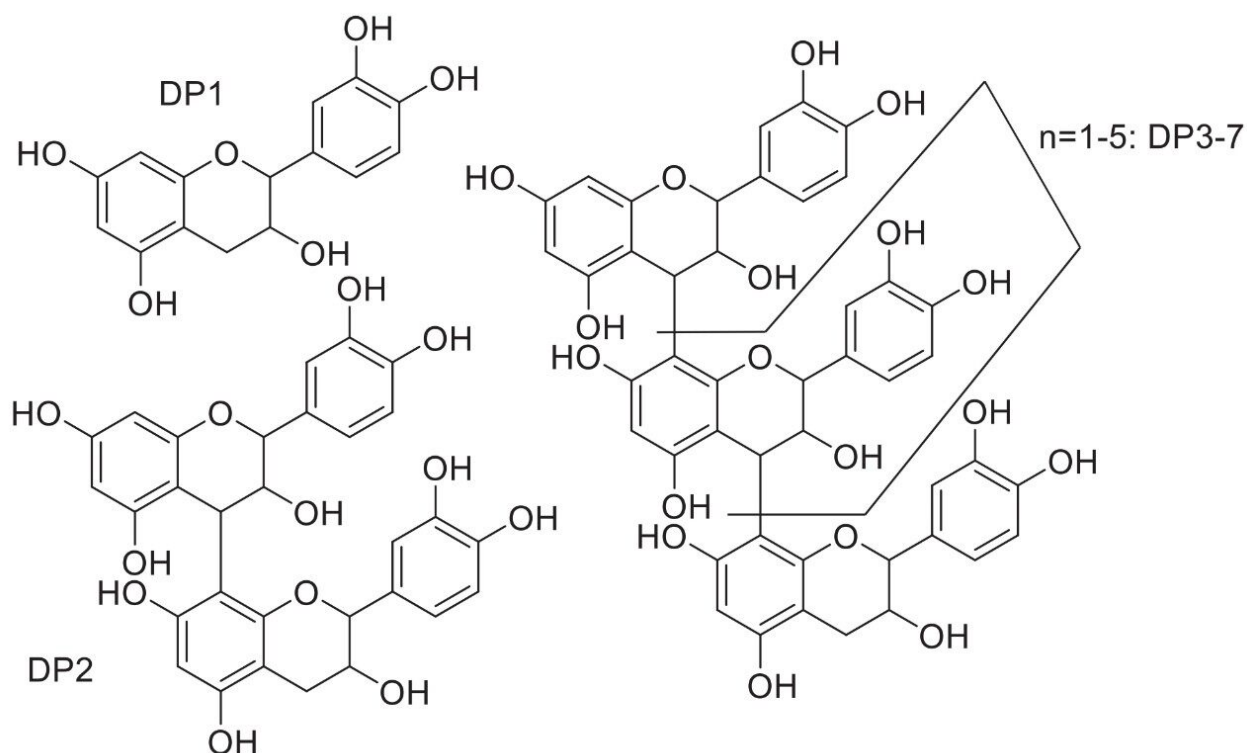


图1.黄烷醇(DP1)和原花青素的结构，包括二聚体(DP2)和三聚体至七聚体(DP3-7)

AOAC International近年来认可将基于亲水作用液相色谱(HILIC)的UPLC-FLR方法作为可可F/PC（聚合度1~7）的官方分析方法（方法AOAC2020.05）⁷。该方法对近期发表的可可黄烷醇和原花青素UPLC-FLR测定法⁸进行了改进，完善了可可粉和巧克力基质的样品前处理流程⁹。由于AOAC2020.05使用HILIC进行分离，因此与反相HPLC相比，系统平衡可能具有挑战性¹⁰。

本应用纪要介绍如何使用AOAC2020.05方法以及系统平衡和样品处理对结果可靠性的影响。使用本方法分析20种可可样品，证明其对于各种浓度和样品类型的适用性。

实验

样品描述

从当地商店购买市售可可类产品，包括可可粉、烘焙巧克力、黑巧克力和可可类膳食补充剂（常见形式为饮料粉和胶囊）。所有样品均按其基质进行标识，后跟一个用于区分不同品牌/制造商的字母；本分析对每种产品使用多个批次。

样品前处理

除膳食补充剂胶囊外，所有样品均根据AOAC2020.05进行制备。可可粉、黑巧克力和烘焙巧克力样品通过连续己烷洗涤脱脂。溶解脱脂后的固体，将其通过Oasis PRiME MCX SPE小柱以去除基质杂质。将粉末状补充剂悬浮于丙酮、水和乙酸的混合溶液(AWA, 70:30:1)中，超声并离心。本研究使用的膳食补充剂胶囊使用抗坏血酸棕榈酸酯作为辅料，会导致F/PC含量被明显低估，并且无法通过SPE处理去除。而使用己烷:异丙醇100:5 (v/v)进行两次连续洗涤，通过固液萃取可去除抗坏血酸棕榈酸酯。

标样制备

按AOAC2020.05所述方法，通过连续稀释NIST可可黄烷醇提取物标准品RM8403，制备校准标样¹¹。首先，称取20 mg RM8403加入100 mL容量瓶中，用AWA溶解，制备工作标样5 (WS5)。然后移取2、4、6和8 mL WS5加入10 mL烧瓶中，用AWA稀释，制备WS1-4。

方法条件

液相色谱条件

液相色谱系统：	ACQUITY UPLC H-Class
检测器：	ACQUITY UPLC FLR检测器；增益 10，发射波长321 nm，激发波长 230 nm 注：每台仪器在运 行AOAC2020.05 方法前必须进行增 益优化
样品瓶/样品板：	LCMS认证的琥珀 色12 × 32 mm螺 纹颈口玻璃瓶，配 有盖子和预切割 PTFE/硅胶隔垫

液相色谱条件

	， 2 mL (部件号 ： 600000669 CV)
色谱柱：	Torus DIOL, 130Å, 1.7 µm, 3.0 mm × 100 mm
柱温：	50 °C
样品温度：	5 °C
进样体积：	2 µL
流速：	1.00 mL/min
流动相A：	乙腈:乙酸98:2 (HPLC级)
流动相B：	甲醇:水:乙酸 95:3:2 (HPLC级)
数据管理：	Empower 3 CDS

梯度

时间 (min)	流速 (mL/min)	%A	%B	曲线
0.00	1.00	100	0	6
0.37	1.00	100	0	6
10.40	1.00	55	45	6
10.65	1.00	5	95	6
13.00	1.00	5	95	6
13.10	1.00	100	0	6
16.10	1.00	100	0	6

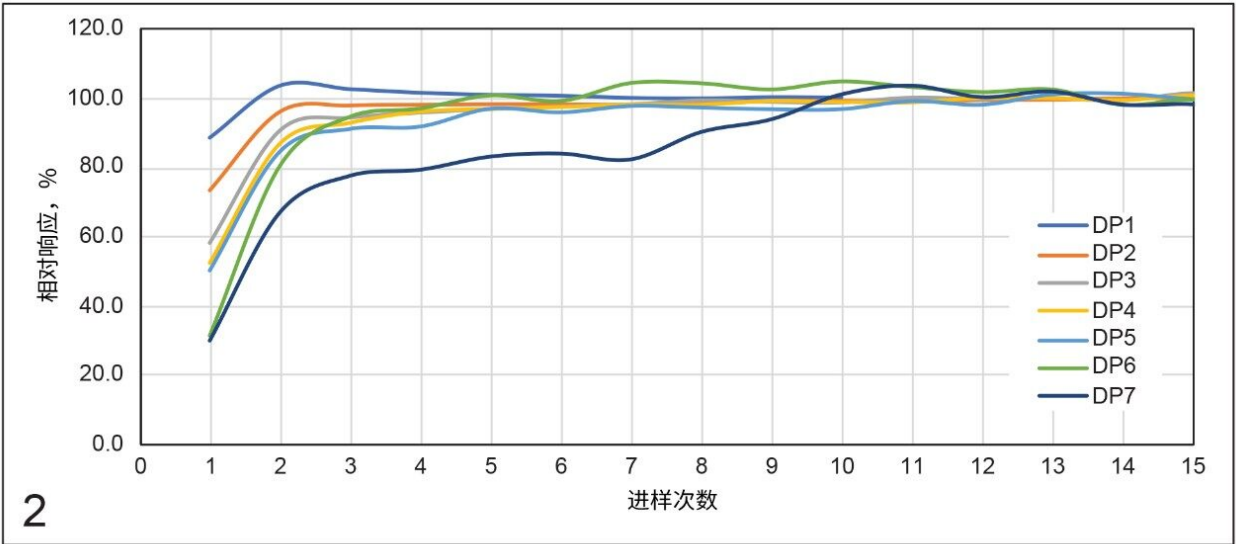
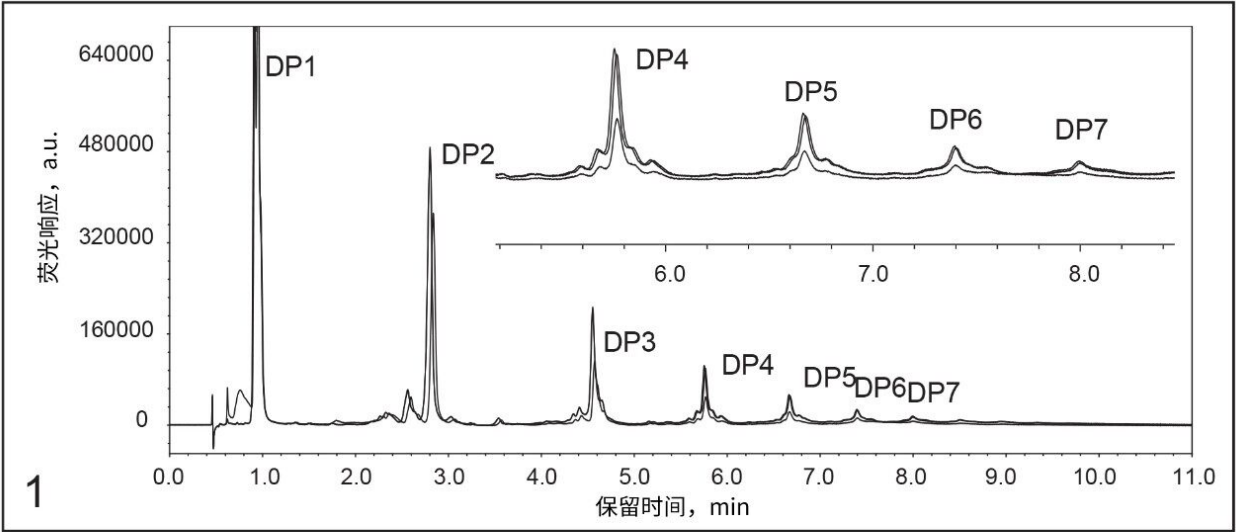
进样序列

1. 五次可可提取物标准品进样 – 用于系统平衡
2. 五次可可提取物标准品进样 – 用于系统适应性（重现性）评估
3. 标准曲线进样
4. 空白进样
5. 样品进样（至多10次）
6. 可可提取物标准品进样 – 系统适应性评估（分段进样）

结果与讨论

将ACQUITY UPLC H-Class系统与FLR检测器联用，可以在16分钟内分离并分析DP高达7的可可F/PC，结果如图2所示。使用Waters Torus DIOL色谱柱按聚合度对可可F/PC进行色谱分离，将分离结果整合为从单体(DP1)到七聚体(DP7)的七种独立信号。

充分活化后：进样1、5、10



充分活化后：进样1、5、10

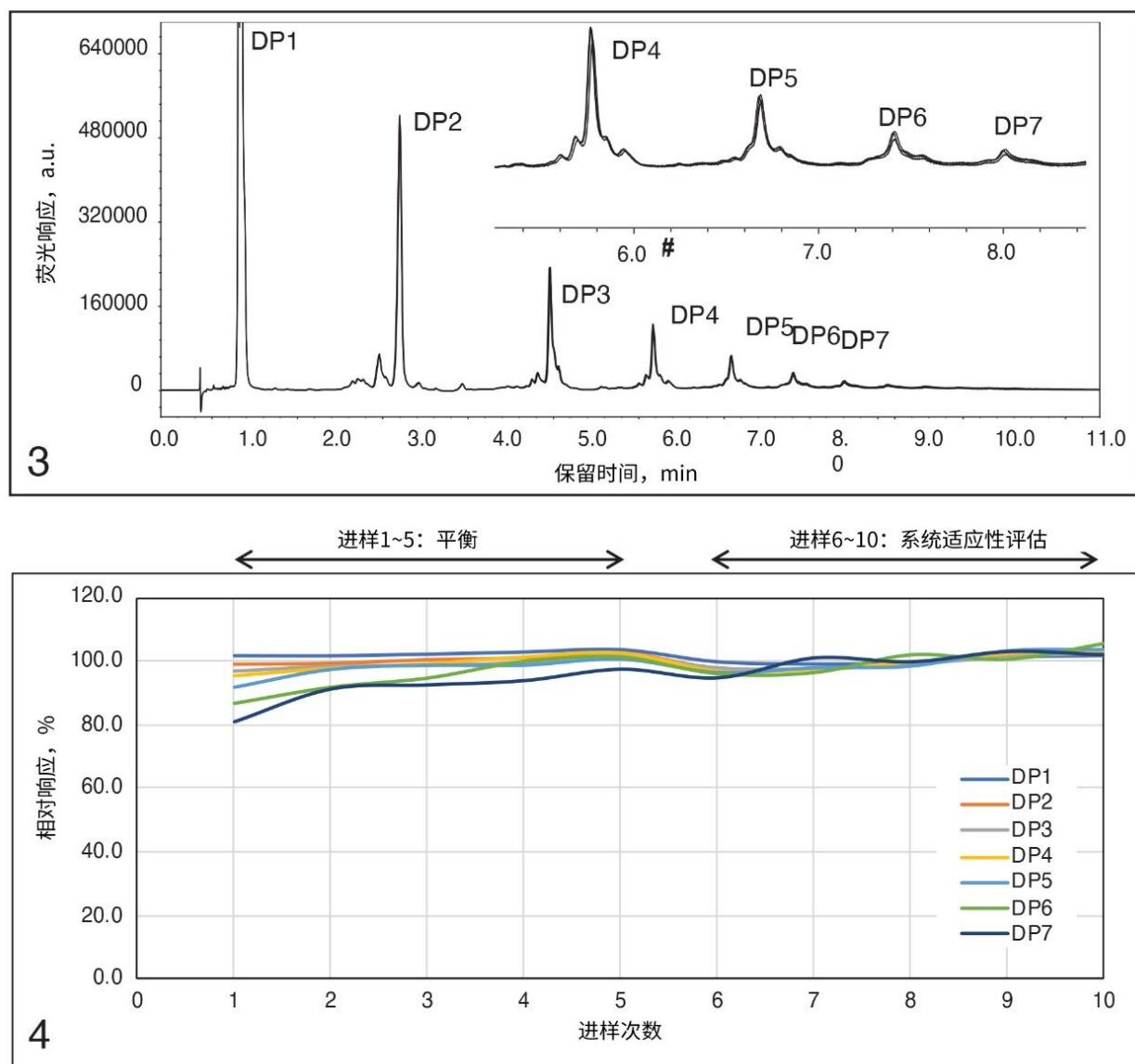


图2.方法平衡对DP1-7信号重现性的影响。第1幅图和第3幅图：*NIST RM8403*第1次、第5次和第10次重复进样结果的叠加图；第2幅图和第4幅图：*NIST RM8403*重复进样15次和10次得到的相对响应。

系统平衡

可可F/PC的分离在HILIC条件下完成，并且需要对AOAC2020.05规定的系统进行平衡。虽然中性和极性目标物可以在HILIC条件下快速实现可重现的保留，但仍需要对检测器响应进行平衡（系统吹扫、色谱柱冲洗和进样钝化样品）以实现可重现的输出¹²。在这种情况下，完全的信号积分对于实现精密测量至关重要。F/PC的每个信号都包含大量立体异构体，导致峰形变宽，需要进行峰谷到峰谷积分。如果系统平衡不佳，这种峰谷到峰

谷积分可能受到严重影响，常见表现为基线波动。图2展示了七个目标信号中未经充分平衡和经过充分平衡的每个信号的相对信号区域。相对信号响应计算为各进样的信号面积与序列中最后五次进样的平均信号面积之比。在经过平衡的系统中，预计相对响应稳定在100%左右。

按照AOAC2020.05中规定的方案，实现充分平衡：

- 在安装色谱柱之前，以4 mL/min的流速灌注每条溶剂管路5 min
- 用50:50流动相A/B平衡色谱柱至少10 min
- 在初始条件下(1 mL/min, 100% A)运行系统约10 min以进行最终平衡
- 进样10次可可提取物标准品以完成平衡

执行不充分的平衡步骤，例如1 min溶剂灌注、5 min色谱柱平衡和5 min系统平衡，随后多次进样可可提取物标准品，证明充分平衡的必要性。

如图2所示，充分的系统平衡可以使不同进样间获得精密的信号面积测量结果，而不充分的平衡则会显著影响目标信号的响应。除显著影响系统适应性在重现性方面的评估结果以外，在重现性评估进样过程中估计的响应不准确可能还会影响后续进样的可靠性。利用最后五次重现性评估进样的平均信号面积评估分段标准品进样的响应。评估分段标准品响应是系统适应性评估的关键要求，因为它可以验证系统在整个序列中是否保持足够高的性能以进行样品分析。

样品净化

为评估样品净化对方法可靠性及后续数据质量的影响，在进样10次以三种不同方式制备的烘焙巧克力后比较系统性能，三种方式分别为：未经SPE净化、强阳离子交换SPE和使用阳离子交换基团的混合模式聚合物SPE (Waters Oasis PRiME MCX)。在进样10次烘焙巧克力样品后进样分段标准品，将所得的信号面积与初始重现性系统适应性进样比较，计算回收率(%)。

以分段标准品中各DP的回收率(%)为指标，评估样品进样对系统性能的影响，结果见表1。将未经SPE处理的样品进样10次后，所有原花青素信号(DP2-7)均受到显著影响，同时导致系统反压升高。观察到信号面积比预期值高25%，与干扰物质有关，导致无法满足系统适应性要求，证明了妥善去除干扰分析的共流出基质杂质的重要性。用水:异丙醇(50:50)进行洗涤后，色谱柱中的污染物流出，反压降低，系统性能得以恢复。然后对系统执行完整的平衡流程。使用强阳离子交换SPE小柱对烘焙巧克力样品进行净化处理后，回收率略有提高。但是，样品对系统反压（累积压力达50~100 bar）仍有显著影响，并且高阶低聚物(DP3-7)的信号响应发生明显漂移。

分析物		DP1	DP2	DP3	DP4	DP5	DP6	DP7
重现性 (%RSD; n=5)		1	2	2	3	3	4	3
分段标准品回收率 (%)	AOAC2020.05 验收标准	95-105	95-105	95-105	95-105	90-110	80-120	80-120
	未经SPE净化	100	106*	110*	110*	112*	116	125*
	强阳离子交换SPE	102	103	108*	110*	111*	114	121*
	MCX PRiME	100	104	103	102	101	103	101

表1. 进样10次未经SPE净化、经过强阳离子交换SPE净化和混合模式阳离子交换SPE净化所制得的烘焙巧克力样品后，分段标准品进样的相对回收率。

*表示分段标准品回收率不满足AOAC2020.05中规定的系统适应性标准。

使用Oasis PRiME MCX SPE小柱进行样品处理有助于精密、准确地测定可可F/PC。如表1所示，在实施混合模式SPE净化的情况下，标准品回收率(%)几乎不存在偏差。重现性计算为系统适应性进样6-10的相对标准偏差。相对地，回收率判定为系统适应性进样6-10中观察到的平均峰面积。充分净化与吸附剂通过混合模式保留机制（反相和阳离子交换）保留更多基质共提物的能力相关。此外，混合模式SPE还可以去除带电荷的脂质或辅料（例如硬脂酸镁），从而提供不含杂质的样品，这些杂质可能污染系统、导致反压升高并干扰荧光检测。稳定的系统压力和可重现的分段标准品进样表明，样品已成功净化。

某些基质样品（例如，以较高浓度配制的膳食补充剂）无需进行SPE净化。实际上，在分析过程中，高浓度样品（例如膳食补充剂）受到基质干扰的可能性较小。在证明关键性能（例如准确度和精密性）并且表明对系统的样品分析性能无影响后，即可针对特定基质优化样品前处理流程。

在市售样品中的应用

方法性能之前已得到证明并发表相关文章⁹。但是，在已发表的文章中，仅有少数提到AOAC2020.05方法在测定实际样品方面的应用。本研究购得20种可可类市售产品，并按照AOAC2020.05进行分析。表2汇总了市售产品（包括黑巧克力和烘焙巧克力、可可粉、预混合膳食补充粉和膳食补充剂胶囊）中可可黄烷醇(DP1)和单个低聚物(DP2-7)的含量以及总可可F/PC含量（字母后缀表示不同的品牌，数字后缀表示不同的批次）。测得样品中可可黄烷醇和原花青素总含量在2.9 mg/g至524 mg/g的范围内，表明使用AOAC2020.05可以表征各种可可类产品。此外，相同产品（同品牌产品，不同批号）表现出相当的结果。这表明，在可可F/PC测量中获得的高精密结果支持按基质类型和制造商区分样品，与先前的报道一致⁸。

基质	DP1 (mg/g)	DP2 (mg/g)	DP3 (mg/g)	DP4 (mg/g)	DP5 (mg/g)	DP6 (mg/g)	DP7 (mg/g)	DP-7总含量 (mg/g)
黑巧克力A1	1.1	0.8	0.8	0.6	0.6	0.4	0.2	4.6
黑巧克力A2	1.0	0.8	0.8	0.6	0.5	0.4	0.3	4.3
黑巧克力B	0.6	0.5	0.5	0.4	0.5	0.4	0.1	3.0
烘焙巧克力A1	1.0	1.0	0.9	0.7	0.5	0.4	0.1	4.7
烘焙巧克力A2	0.9	0.8	0.8	0.6	0.5	0.4	0.1	4.1
烘焙巧克力A3	0.6	0.5	0.5	0.4	0.4	0.3	0.2	2.9
烘焙巧克力B1	1.1	1.3	1.4	1.2	1.0	0.8	0.7	7.4
烘焙巧克力B2	1.1	1.3	1.4	1.1	1.0	0.8	0.6	7.3
可可粉A1	3.3	2.5	2.2	1.6	1.3	1.0	0.4	12.3
可可粉A2	3.3	2.6	2.3	1.6	1.3	1.0	0.5	12.6
可可粉A3	3.0	2.5	2.3	1.8	1.5	1.1	0.5	12.6
可可粉B	3.4	3.1	3.1	2.6	2.2	1.6	0.7	16.7
可可粉C	4.2	3.8	3.6	2.8	2.4	1.6	0.8	19.3
即饮补充剂A1	13.6	12.6	15.6	12.2	10.3	8.4	6.0	78.6
即饮补充剂A2	12.2	11.5	13.7	11.8	9.7	7.6	5.4	71.8
即饮补充剂B1	17.8	12.9	13.7	12.1	10.0	7.8	6.1	80.4
即饮补充剂B2	19.3	14.1	15.0	12.2	10.9	8.4	6.4	86.4
补充剂胶囊A1	116.1	81.2	86.6	74.5	66.0	52.4	40.5	517.5
补充剂胶囊A2	116.4	81.0	86.7	76.7	67.0	51.6	45.2	524.5
补充剂胶囊B	109.4	78.8	85.1	73.5	63.4	50.8	41.4	502.3

表2.可可类商品中可可黄烷醇和原花青素含量汇总

结论

本研究使用官方分析方法AOAC2020.05分析可可类基质中聚合度高达7的可可黄烷醇和原花青素。使用该方法规定的系统适应性标准评估系统平衡的影响。本应用纪要所述的平衡步骤虽然冗长，但已被证明对方法性能至关重要，因此应在每批样品分析中实施。按照AOAC2020.05的规定平衡系统时，将获得精密且一致的结果，可通过系统适应性评估得到证明。

利用系统适应性进样监测系统性能，并以烘焙巧克力为例，评估由于样品前处理不充分引起的偏差。除系统反压升高以外，基质杂质对系统的污染还导致原花青素含量被高估多达25%。通过使用混合模式阳离子交换和去除带电脂质固相萃取进行样品处理，可以消除这些干扰物。

最终，该方法成功测定了可可黄烷醇和原花青素含量在3 mg/g至500 mg/g范围内的市售可可类食品和膳食补充剂。这些结果与系统适应性实验一同证明了AOAC2020.05方法的通用性，及其在可可类食品和膳食补充剂中日常分析黄烷醇和原花青素的可靠性。

参考资料

1. Brickman AM, Khan UA, Provenzano FA, Yeung LK, Suzuki W, Schroeter H, Wall M, Sloan RP, Small SA. Enhancing Dentate Gyrus Function with Dietary Flavanols Improves Cognition in Older Adults. *Nat. Neurosci.*, 2014, 17(12): 1798–803.
2. Heiss C, Sansone R, Karimi H, Krabbe M, Schuler D, Rodriguez-Mateos A, Kraemer T, Cortese-Krott MM, Kuhnle GG, Spencer JP, Schroeter H, Merx MW, Kelm M, Flaviola Consortium, E.U.t.F.P. Impact of Cocoa Flavanol Intake On Age-Dependent Vascular Stiffness In Healthy Men: A Randomized, Controlled, Double-Masked Trial. *Age (Dordr)*, 2015, 37(3): 9794.
3. Kelm MA, Johnson JC, Robbins RJ, Hammerstone JF, Schmitz HH. High-Performance Liquid Chromatography Separation and Purification of Cacao (*Theobroma cacao* L.) Procyanidins According to Degree of Polymerization Using a Diol Stationary Phase. *J. Agric. Food Chem.*, 2006, 54(5): 1571–6.
4. Adamson GE, Lazarus SA, Mitchell AE, Prior RL, Cao G, Jacobs PH, Kremers BG, Hammerstone JF, Rucker RB, Ritter KA, Schmitz HH. HPLC Method for The Quantification of Procyanidins in Cocoa and Chocolate Samples and Correlation to Total Antioxidant Capacity. *J. Agric. Food Chem.*, 1999, 47(10): 4184–4188.
5. Hammerstone JF, Lazarus SA, Mitchell AE, Rucker R, Schmitz HH. Identification of Procyanidins in Cocoa (*Theobroma cacao*) and Chocolate Using High-Performance Liquid Chromatography/Mass Spectrometry. *J. Agric. Food Chem.*, 1999, 47(2): 490–496.
6. Lazarus SA, Adamson GE, Hammerstone JF, Schmitz HH. High-Performance Liquid Chromatography/Mass Spectrometry Analysis of Proanthocyanidins in Foods and Beverages. *J. Agric. Food Chem.*, 1999, 47(9): 3693–701.
7. AOAC. 2020: Official Method of Analysis 2020.05.
8. Bussy U, May BR, Olanrewaju Y, Hewitt G, Anderson N, Crozier A, Ottaviani JI, Kwik-Urbe C. Reliable, Accessible, and Transferable Method for the Quantification of Flavanols and Procyanidins in Foodstuffs and Dietary Supplements. *Food Funct.*, 2020, 11(1): 131–138.
9. Bussy U, Hewitt G, Olanrewaju Y, May BR, Anderson N, Ottaviani J, Kwik-Urbe C. Single-Laboratory Validation for the Determination of Cocoa Flavanols and Procyanidins (by Degree of

Polymerization DP1–7) in Cocoa-Based Products by Hydrophilic Interaction Chromatography Coupled with Fluorescence Detection: First Action 2020.05. *J. AOAC Int.*, 2020.

10. McCalley DV. A Study of Column Equilibration Time in Hydrophilic Interaction Chromatography. *J. Chromatogr. A*, 2018, 1554: 61–70.
11. Rimmer CA, Lippa KA, Yen J, Bussy U, Anderson N, Kwik-Urbe C. Reference Material 8403 Cocoa Flavanol Extract. *NIST Special Publication*, 2020.
12. Bell DS, Shollenberger DL. Investigation of Re-equilibration in Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography. *LCGC*, 2016 29(12): 687–692.

致谢

Ugo Bussy (Mars, Incorporated)、Jinchuan Yang (沃特世公司)、Hong You (Eurofins Scientific)、Nicholas Anderson (Mars, Incorporated)、Emily R Britton (沃特世公司) 以及 Catherine Kwik-Urbe (Mars, Incorporated)。

特色产品

ACQUITY UPLC H-Class PLUS系统 <<https://www.waters.com/10138533>>

ACQUITY UPLC FLR检测器 <<https://www.waters.com/514222>>

Empower色谱数据系统 <<https://www.waters.com/waters/nav.htm?cid=513188>>

720007121ZH, 2021年1月