

AOAC方法转换：使用Arc™ HPLC和UV-Vis检测器测定含有紫锥菊的膳食补充剂和膳食成分中的酚类化合物

Kim Van Tran, Peter Hancock

Waters Corporation

摘要

酚类化合物在含有紫锥菊的膳食补充剂和膳食成分中很常见，如单咖啡酰酒石酸、绿原酸、洋蓟酸、松果菊苷和菊苣酸。在本应用纪要中，我们对AOAC官方方法2018.08进行了直接转换¹。官方方法描述了建议用于评估方法设置是否成功的最低性能特征。本研究将Arc HPLC系统与紫外/可见光(UV/Vis)检测器、CORTECS™ T3分析柱和Empower™ 3色谱数据系统(CDS)软件搭配使用，展示了一种符合AOAC方法要求的方法转换，用于测定紫锥菊茶、胶囊和液体中的酚类化合物。

优势

- 使用Arc HPLC可以缩短转换后方法的分析时间、降低流速且减少溶剂消耗，有助于提高实验室效率
- CORTECS T3色谱柱可改善邻近洗脱化合物的分离效果、方法重现性和准确度，超过AOAC方法建议的最低性能特征
- Waters™方法转换计算器工具使梯度液相色谱(LC)方法转换更轻松

简介

酚类化合物在紫锥菊补充剂中十分常见，如单咖啡酰酒石酸、绿原酸、洋蓟酸、松果菊苷和菊苣酸等，常用于预

防和治疗上呼吸道感染，如普通感冒和流感，还可以用作免疫兴奋剂²。紫锥菊是成人和儿童常用的非维生素/矿物质膳食补充剂和天然产品³。随着紫锥菊产品越来越受欢迎，其产品种类也在不断增加。AOAC发布了AOAC官方分析方法2018.08“HPLC-UV法测定含有紫锥菊的膳食补充剂和膳食成分中的酚类化合物，首次发布于2018年” (AOAC Official Method 2018.08 Phenolic Compounds in Dietary Supplements and Dietary Ingredients Containing Echinacea HPLC-UV First Action 2018)的标准方法性能要求(SPMR)。该SPMR描述了建议用于评估方法的最低性能特征。在本应用纪要中，AOAC方法2018.08成功转换到搭配UV-Vis检测器、CORTECS T3色谱柱和Empower 3 CDS软件使用的Arc HPLC系统上。

实验

材料与试剂

标准化合物

单咖啡酰酒石酸、绿原酸、洋蓟酸和松果菊苷购自Cayman Chemical。菊苣酸标准品购自Fisher Scientific。

试剂

乙腈和甲醇（HPLC级）购自Honeywell Research Chemicals。

磷酸LiChropur™ (85%)购自Supelco。

水来自PureLab flex ELGA系统（美国LabWater）

含有酚类化合物的产品购自当地零售商（马萨诸塞州）。

样品制备

校正标准品的制备：在60:40 (v/v)甲醇:水中制备浓度为1000 µg/mL的单标，并于-20 °C储存。

标准品的校正浓度范围如下所述。

样品制备：如AOAC方法中所述

	浓度(pg/mL)						
	标准品1	标准品2	标准品3	标准品4	标准品5	标准品6	标准品7
单咖啡酰酒石酸	150	100	50	25	10	5	1
绿原酸	50	20	10	5	2	1	0.2
洋蓟酸	50	20	10	5	2	1	0.2
松果菊苷	300	200	100	50	20	10	2
菊苣酸	200	100	50	25	10	5	1

校正曲线浓度

液相色谱条件

液相色谱系统:	Arc HPLC系统
检测:	PDA, 单波长, 330 nm 2998 PDA谱图, 200~600 nm
样品瓶:	通过LCGC认证的透明玻璃最大回收样品瓶, 配有盖子和预切割PTFE/硅胶隔垫, 容积1.5 mL (P/N: 186000327C)
过滤器:	0.2 μm PTFE针式过滤器(P/N: WAT200556)
色谱柱:	CORTECS T3色谱柱, 120 Å, 2.7 μm, 3 mm x 100 mm (P/N: 186008489)
柱温:	25 °C
样品温度:	5 °C
进样体积:	茶叶和胶囊3 μL, 浓缩液体样品2 μL
流速:	1.18 mL/min

流动相A: 0.1%磷酸的水溶液

流动相B: 乙腈

样品稀释剂: 甲醇:水(60:40)

方法转换的梯度

时间	%A	%B
0.00	90	10
4.68	78	22
5.04	60	40
5.22	60	40
6.48	90	10

结果与讨论

使用沃特世方法转换计算器2.0工具⁴，将液相色谱方法条件转换到CORTECS T3色谱柱上，并正确缩放色谱柱尺寸、梯度色谱柱体积、系统延迟体积和进样体积。AOAC方法使用5 μm粒径的C₁₈反相色谱柱，而在现代化Arc HPLC系统上可以使用粒径为2.7 μm的CORTECS T3色谱柱。粒径更小有利于缩短色谱柱长度，同时仍能保持所需的色谱性能，从而缩短运行时间并减少流动相消耗。图1即为将原始梯度转换到CORTECS T3色谱柱所用的方法转换计算器工具。

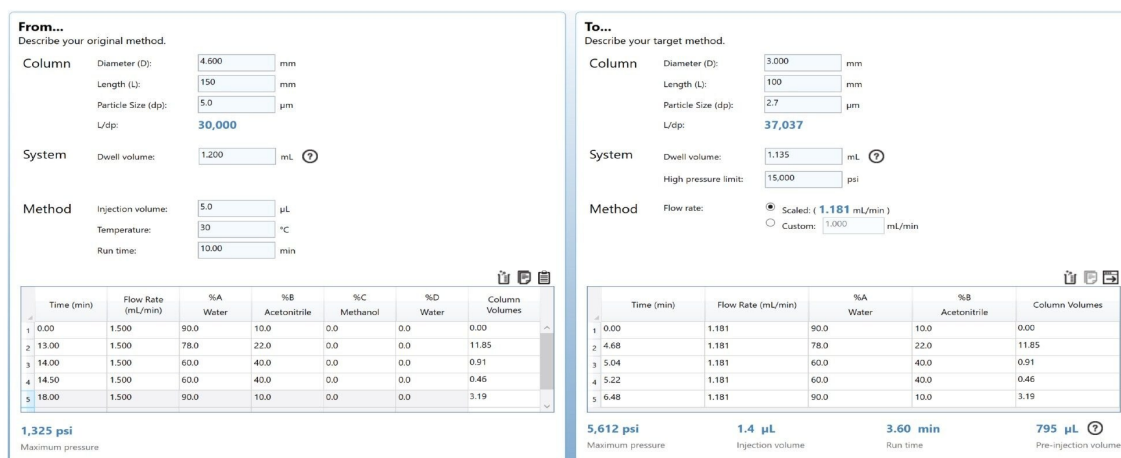


图1.用于梯度转换的方法转换计算器

使用Empower CDS软件确定最低浓度校正标准品#7的信噪比、分离度和拖尾因子。本研究中所有酚类化合物的分离度均 ≥ 2.8 。方法的检测限(LOD)和定量限(LOQ)均低于校正标准品#7的浓度。在CORTECS T3色谱柱上分离校正标准品#7中酚类化合物的色谱图如图2所示。

校正曲线：线性、峰面积精密度和保留时间

按照AOAC方法的样品制备部分所述，制备酚类化合物的多点校正曲线。校正曲线显示出良好的线性($R^2 \geq 0.995$)，如图3所示。

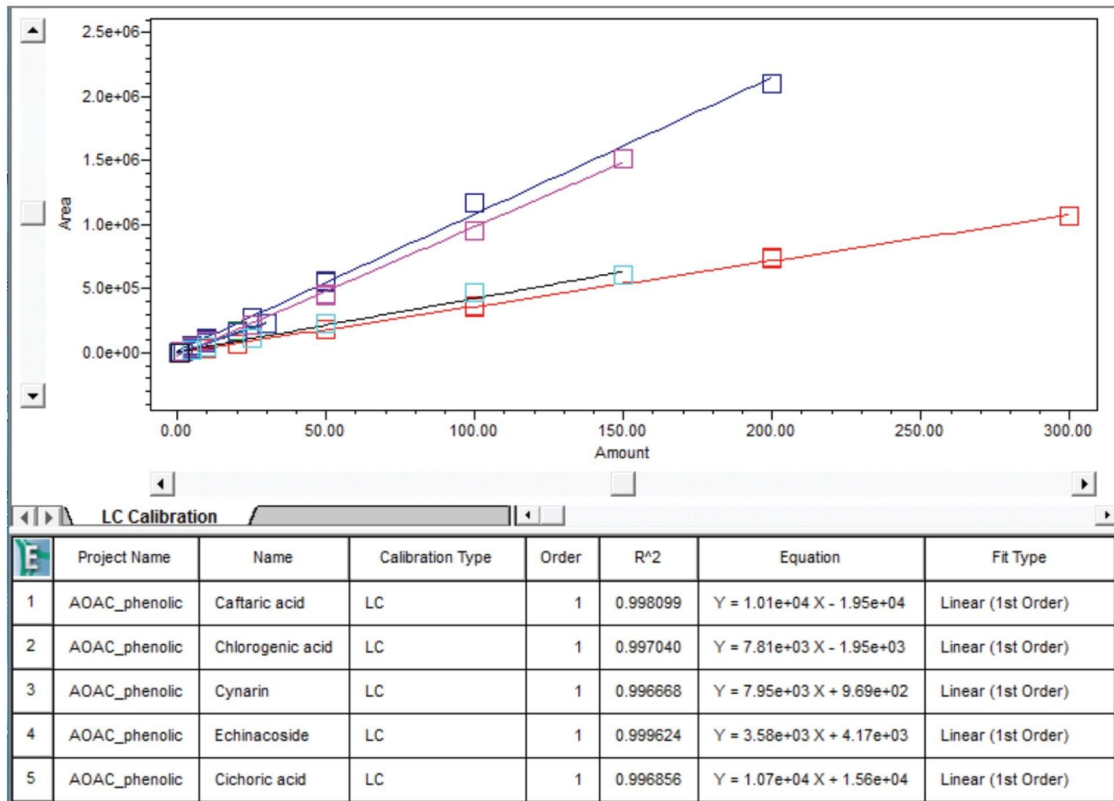
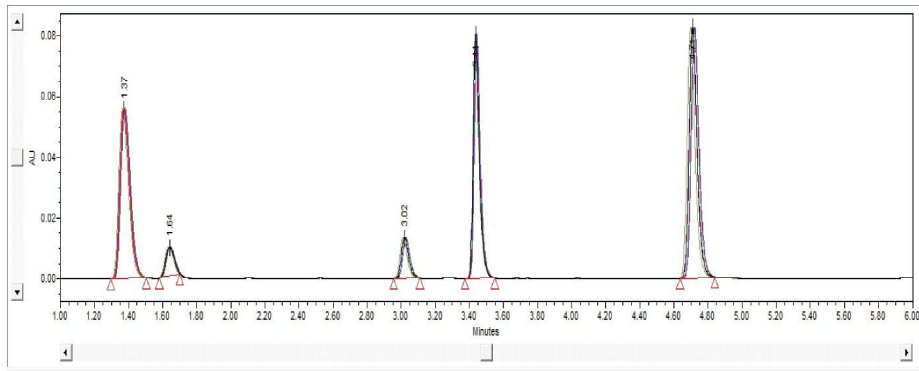


图3.酚类化合物的校正曲线

系统适应性

AOAC方法建议通过五次重复进样校正标准品#4来确定系统适应性。图4显示了校正标准品#4的色谱图以及五次重复进样的%RSD。每种酚类化合物峰面积的%RSD均<0.7%，完全在官方方法规定的SMPR限值内。



	RT
1)单咖啡酰酒石酸	1.37
2)绿原酸	1.64
3)洋蓟酸	3.02
4)松果菊苷	3.44
5)菊苣酸	4.71

	Caftaric acid	Chlorogenic acid	Cynarin	Echinacoside	Cichoric acid
1	222553	34603	39729	200646	272296
2	222627	34624	39700	200462	272225
3	222273	34372	39753	200358	271711
4	224163	34946	40165	202004	274489
5	223628	34339	39970	201473	273877
Mean	223049	34577	39863	200989	272920
Std. Dev.	807	244	199	717	1195
% RSD	0.4	0.7	0.5	0.4	0.4

图4. 标准品#4的系统适应性测试

酚类化合物产品分析

每种样品制备三份重复样，根据紫锥菊胶囊和茶的重量百分比计算出每种酚类化合物的含量。液体紫锥菊的结果按体积百分比计算。表1显示了含酚类化合物产品分析的定量结果及%RSD。

图5显示了含酚类化合物产品分析的代表性色谱图。

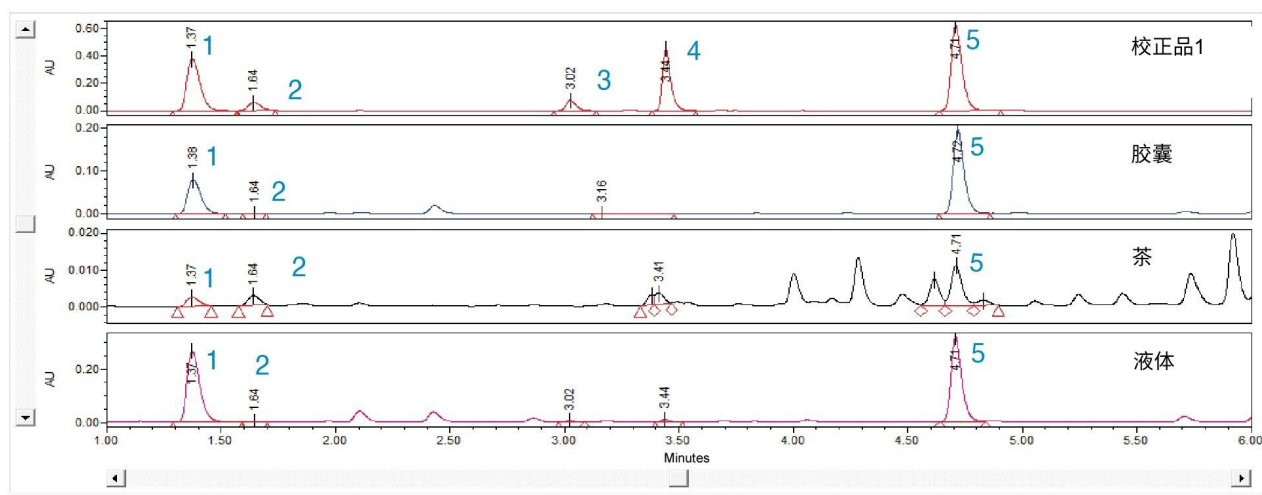


图5.酚类化合物产品分析的色谱图

结论

在本应用纪要中，AOAC方法2018.08成功转换到使用CORTECS T3 2.7 μm 粒径色谱柱的Arc HPLC系统上。使用实心核颗粒色谱柱技术改善了单咖啡酰酒石酸和绿原酸以及洋蓟酸和松果菊苷之间的分离。使用CORTECS T3色谱柱提高了分离效率，不仅可以更轻松地对目标化合物峰积分，还可以更好地分离目标化合物和供试品中存在的其他基质共提取物。示例可参见茶样品的色谱图。得益于分离的改善，运行时间从18分钟减少到7分钟以内，不仅缩短了分析时间，还减少了流动相用量。使用沃特世方法转换计算器正确调整了梯度方法条件和进样体积。方法转换到Arc HPLC和CORTECS T3色谱柱上之后表现出优异的分度、重现性、准确度和线性，并且符合SMPR对该方法规定的要求。总体而言，将方法转换到Arc HPLC和CORTECS T3色谱柱上有诸多优势，包括运行时间更短、流速更低、溶剂消耗更少以及酚类化合物的分离得到改善。

参考资料

1. AOAC Official Method 2018.08 Phenolic Compounds in Dietary Supplements and Dietary Ingredients

Containing Echinacea HPLC-UV First Action 2018.

2. David S, Cunningham R. Echinacea for the prevention and treatment of upper respiratory tract infections: a systematic review and meta-analysis. *Complementary Therapies in Medicine*. 2019; 44:18–26.
3. Barnes PM, Bloom B, Nahin RL. National Center for Health Statistics. [accessed August 25, 2011]; *Vital Health Stat*. 2008 Series No.12, <http://www.cdc.gov/nchs/data/nhsr/nhsr012.pdf> <<http://www.cdc.gov/nchs/data/nhsr/nhsr012.pdf>> .
4. 方法转换计算器2.0版发行说明(waters.com) <<https://www.waters.com/webassets/cms/support/docs/716004729ra.pdf>> .

特色产品

Arc HPLC系统 <<https://www.waters.com/waters/nav.htm?cid=135068659>>

2998光电二极管阵列(PDA)检测器 <<https://www.waters.com/1001362>>

Empower色谱数据系统 <<https://www.waters.com/10190669>>

720007726ZH, 2022年9月

© 2023 Waters Corporation. All Rights Reserved.

[使用条款](#) [隐私](#) [商标](#) [网站地图](#) [招聘](#) [Cookie](#) [Cookie设置](#)

沪ICP备06003546号-2 京公网安备 31011502007476号