

## 通过SFE-SFC工作流程纯化香草豆中的香草醛

Jacquelyn Runco  
沃特世公司(美国马萨诸塞州米尔福德)

### 应用优势

- MV-10 ASFE®是一款可提取少量样品的超临界流体萃取系统，可通过筛选萃取参数优化提取率，并最大限度简化提取过程
- 使用无毒的CO<sub>2</sub>和乙醇，而不是有毒的有机溶剂进行萃取和随后的纯化
- 验证了纯化香草豆中的香草醛的超临界流体完整解决方案，该流程还适用于其它应用

### 沃特世解决方案

MV-10 ASFE®系统  
Prep 80q SFC系统  
2489 UV/Vis检测器  
ChromScope™软件  
ACQUITY UPC<sup>2</sup>®系统  
ACQUITY UPC<sup>2</sup> PDA检测器  
MassLynx®软件  
ACQUITY UPC<sup>2</sup> BEH 2-乙基吡啶色谱柱，  
130Å, 1.7 μm, 3 x 100 mm  
Viridis® BEH 2-乙基吡啶OBD Prep色谱柱，  
130Å, 5 μm, 19 x 150 mm

### 关键词

风味物质，纯化，SFE，SFC，UPC<sup>2</sup>，  
提取，香草，香草醛，天然产物

### 简介

从药物成分和保健品成分到风味物质和香味物质，大自然中充满了可用于制造各种消费品的目标化合物。目前，天然香料的需求量非常大，这一趋势与人们消费意识的增强以及对传统或有机食品的追求密切相关<sup>1</sup>。香草口味是全世界最受欢迎的风味之一，它被应用于冰淇淋、酸奶、饮料、焙烤食品、谷类食品乃至巧克力等产品。香草醛是产生典型香草风味的主要香味成分，根据香草豆的来源和处理方法的不同，香草醛的含量也各不相同<sup>2</sup>。天然香草提取物根据其中香草醛浓度水平的不同，售价约为\$1800/kg(约\$800/lb)，而合成香草醛售价为\$25/kg(约\$10/lb)<sup>1</sup>。

目前，应用最为广泛的两种香草豆提取技术分别是耗时2-3天的渗滤法(使用乙醇和水)和耗时8-9天的油树脂法(使用乙醇)。其它方法还包括超临界流体CO<sub>2</sub>萃取法；该方法得到的提取物质量高、耗时短，香草醛浓度更高，但该方法的成本也因此更高<sup>3,4</sup>。

超临界流体工作流程使用添加或不添加有机改性剂的CO<sub>2</sub>来萃取(SFE)和纯化(SFC)目标化合物。使用CO<sub>2</sub>作为溶剂非常安全，而且通过该流程获得的提取物没有生物污染物，保质期更长，效果更好，并且解决了残留溶剂浓度这一受到国际关注的主要问题<sup>3</sup>。在此我们将展示一套完整的SFE-SFC工作流程解决方案—使用MV-10 ASFE系统(MV-10)和Prep 80q SFC系统(图1)从完整的香草豆中提取和纯化香草醛。该流程还可用于纯化多种天然产物和基质中的目标化合物。

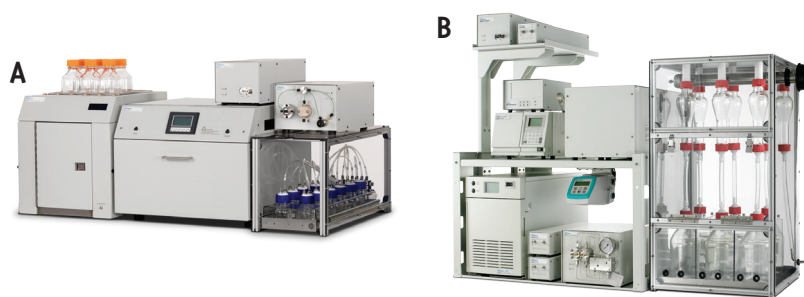


图1.用于提取和纯化香草醛的MV-10 ASFE (A)和Prep 80q SFC (B)系统。

## 实验

## 样品描述和提取

从当地超市购买完整的墨西哥香草豆。首先，使用三个5 mL的萃取容器分别提取约2 g切碎的墨西哥香草豆，以评估三种不同的SFE溶剂条件。调整相应的补偿泵液流速，使乙醇以1.5 mL/min的总流速流进收集瓶。这些条件如表1所示。将提取物稀释至100 mL以进行分析。本实验只确定了相对产量，并未试图完全提取出香草醛。为得到纯净的香草醛，使用Prep 80q SFC系统从提取物中分离和收集香草醛。

## 提取物和馏分分析

所有的支持分析均在ACQUITY UPC<sup>2</sup>系统中进行。为了确定提取物和馏分的产量，我们使用浓度为0.01-0.5 mg/mL的香草醛标准品在ACQUITY UPC<sup>2</sup>系统中生成了一条线性校准曲线 ( $R^2=0.9999$ )。为了确定Prep 80q SFC的馏分回收率，我们通过5次进样2 mL标准品并直接收集进样器的样品流制备了进样标准品。将标准品和馏分稀释至50 mL以进行分析。

## 方法条件

## SFE条件

系统: MV-10 ASFE系统  
 软件: ChromScope v1.5  
 流动相A: CO<sub>2</sub>  
 流动相B: 乙醇(200验证HPLC级)  
 流速: 10 mL/min  
 补偿泵液溶剂: 乙醇(200验证HPLC级)  
 柱压: 300 Bar  
 温度: 40 °C

方法步骤:

提取容器 #	流动相 B (%)	流动相 B (mL/min)	补偿泵液流速 (mL/min)	动态1: 3 min	静态: 60 min	动态2: 30 min
1	0	0	1.5			
2	5	0.5	1			
3	10	1	0.5			

表1. MV-10 SFE方法筛选条件。

## SFC 80q制备型SFC条件

系统: 配备2489 UV/Vis检测器的Prep 80q SFC系统  
 软件: ChromScope v1.2.1  
 流动相A: CO<sub>2</sub>  
 流动相B: 乙醇(HPLC试剂级)  
 流速: 72 mL/min  
 梯度: B在4.5 min内从5%增加至15%  
 柱压: 220 Bar  
 温度: 40 °C  
 UV: 267 nm  
 制备柱: Viridis 2-EP色谱柱(19 x 150mm, 5 μm)  
 进样体积: 2 mL

## 提取物和馏分分析

系统: ACQUITY UPC<sup>2</sup>系统  
 软件: MassLynx v4.1  
 流动相A: CO<sub>2</sub>  
 流动相B: 乙醇(200验证HPLC级)  
 流速: 1.5 mL/min  
 梯度: 在5 min内从2%升至20%  
 柱压: 150 bar  
 温度: 40 °C  
 分析柱: ACQUITY UPC<sup>2</sup> BEH 2-EP色谱柱(3 x 100 mm, 1.7 μm)  
 进样体积: 2 μL

## PDA

扫描: 220–400 nm  
 吸光度  
 补偿: 267 nm  
 参比波长: 320–400 nm

## 结果与讨论

SFE方法开发过程中需要考虑两大因素——产量和提取的复杂程度。对于不同的具体应用，总产量固然重要，但是提取的复杂程度对于纯化过程的重要性也不可小觑。如果提取物中目标化合物的浓度较高(即使产量相对较低)，杂质较少，则可简化收集过程并提高其效率。在条件允许的情况下，与食品相关的应用应选择仅采用CO<sub>2</sub>的提取条件，因为这样可保障消费者安全，并且不会产生有机溶剂废液。

我们使用墨西哥香草豆，利用MV-10 ASFE系统的自动化功能进行SFE方法开发。通过软件控制实现的自动化让用户能够编程多种样品的提取条件，并让系统无人值守地运行。分别在0%、5%和10%的乙醇浓度条件下执行三个样品的提取。最终提取物的色谱分析结果及其产量如图2所示。平均产量为24.2 mg，占初始样品(约2 g)的1.2%。提取物产量以及复杂程度的统计差异极小。由于首选仅使用CO<sub>2</sub>的方法，我们选择了0%乙醇条件下的提取物进行纯化。

一般来说，如果纯化是最终目标，那么进行分析型的方法开发更加实用，因为这样能够节省溶剂、节约时间和减少样品用量。ACQUITY UPC<sup>2</sup>系统中的初始梯度为乙醇在5 min内从2%升至20% (1.44%/cv)，香草醛在约6%处洗脱。为了优化分离效果以便后续进行纯化，我们修改了梯度并进行了上样量研究(图3)。修改后的梯度为乙醇在3 min内从5%升至15% (1.33%/cv)。在此条件下，分离体积维持在10  $\mu$ L，同时缩短了总运行时间。

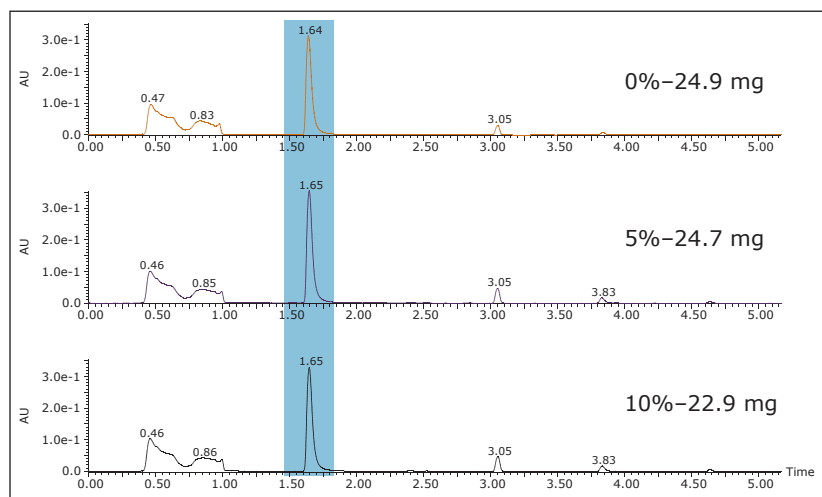


图2. 在0%、5%和10%乙醇的提取条件下，墨西哥香草豆提取物的UPC<sup>2</sup>分离结果以及香草醛的产量。流速1.5 mL/min，梯度为5 min内从2%升至20%，150 bar，40°C，2  $\mu$ L进样，PDA吸光度补偿267 nm。香草醛峰以蓝色突出显示。

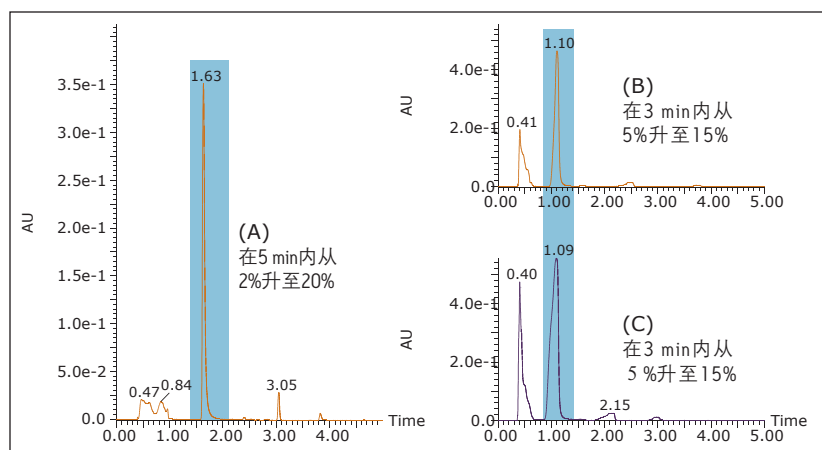


图3. 在ACQUITY UPC<sup>2</sup>系统上进行的方法放大修改(A和B)以及上样量研究(B和C)。流速1.5 mL/min，150 bar，40°C，PDA吸光度补偿267 nm。香草醛峰以蓝色突出显示。

将优化的UPC<sup>2</sup>方法参数放大至19 x150 mm Viridis 2-EP Prep色谱柱，梯度相应地调整为4.5 min内从5%升至15%。考虑到色谱柱的小粒度以及ACQUITY UPC<sup>2</sup>系统的管线内径，前端压力被设为260 bar(系统的压力降低了110 bar)。为确保分离的一致性，需要在相似的压力下操作两个系统。为了维持Prep 80q SFC系统260 bar的前端压力，BPR压力被设置为220 bar(压力降低了40 bar)。经计算，扩大后的上样量为600 μL，但实验分离可采用更大的上样量，因此我们选择了2 mL的进样量(图4)。

Prep 80q SFC系统专为大规模纯化而设计，适用于需要纯化大量单一样品的应用。Prep 80q SFC系统可兼容各种收集方法，本研究的馏分根据时间收集。使用ACQUITY UPC<sup>2</sup>系统对SFC 80收集到的香草醛馏分的纯度和回收率进行了评估。图5展示了SFC 80上的馏分收集以及使用UPC<sup>2</sup>对收集的馏分进行分析的结果。根据UV色谱图上的峰面积可知，初始提取物中仅含36%的香草醛，经SFC 80纯化后，馏分几乎为100%的香草醛(没有检测到杂质)。提取物中香草醛的回收率超过90%。

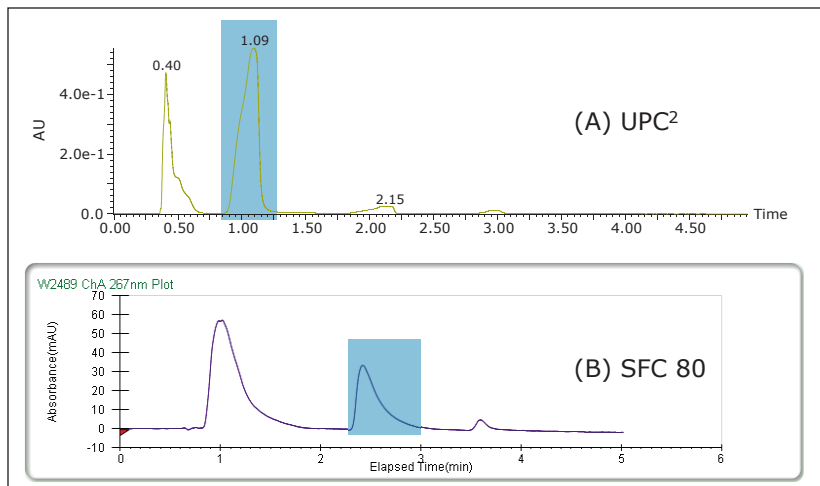


图4. 从ACQUITY UPC<sup>2</sup>系统将方法放大到Prep 80q SFC系统(B)的色谱图。条件: (A) 流速1.5 mL/min, 梯度为3 min内从5%升至15%, 150 bar, 40 °C, 10 μL进样, PDA吸光度补偿267 nm (B) 流速72 mL/min, 梯度为4.5 min内从5%升至15%, 220 bar, 40 °C, 2 mL进样, UV/Vis 267nm。香草醛峰以蓝色突出显示。

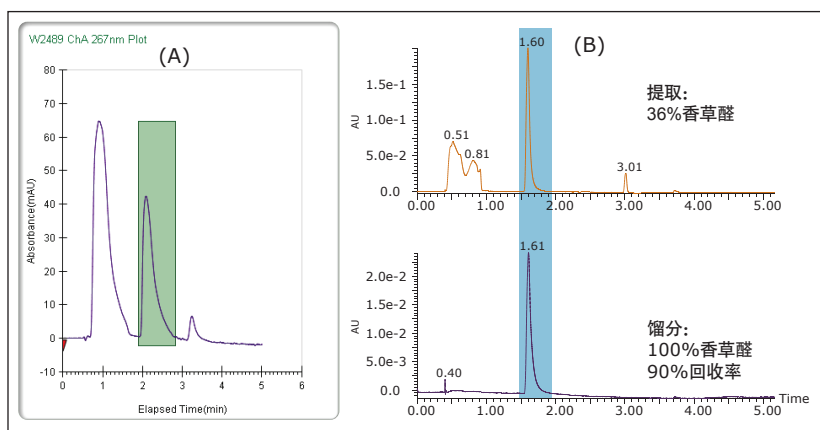


图5. (A)在Prep 80q SFC系统上进行收集的结果以及(B)使用ACQUITY UPC<sup>2</sup>系统分析馏分与提取物的结果比较。条件: (A) 流速72 mL/min, 梯度为3 min内从5%升至15%, 220 bar, 40 °C, 2 mL进样, UV/Vis 267nm, 收集的馏分采用绿色标记。(B) 流速1.5 mL/min, 梯度为5 min内从2%升至20%, 150 bar, 40 °C, 2 μL进样, PDA吸光度补偿267 nm。香草醛峰以蓝色突出显示。

## 结论

- 展示了提取、纯化和分析香草豆中的香草醛的超临界流体完整工作流程解决方案，与其它传统方法相比，该方法可减少溶剂消耗，缩短处理时间。
- MV-10 ASFE系统可利用通过软件控制的自动化流程筛选三个溶剂条件，让香草豆提取的方法开发更加简便。
- 验证了成功将ACQUITY UPC<sup>2</sup>分离放大至Prep 80q SFC的可行性，因此可充分利用ACQUITY UPC<sup>2</sup>系统的快速方法开发优势。
- 使用Prep 80q SFC系统可从原始提取物中成功分离出香草醛。
- 整个工作流程仅使用无毒的CO<sub>2</sub>和乙醇作为流动相或萃取溶剂，是食品相关应用的理想之选。
- 本文所展示的流程可用于分离许多天然产物应用中的目标化合物。

## 参考文献

1. A.M. Rouhi, "Indulging the chemical senses", *C&EN*, July 14, 2003, 53-60.
2. <http://www.mccormickflavor.com/public/MCFLAVOR/assets/VANILLA.PDF>
3. [http://www.celkai.in/Crops/Spices/Vanilla/vanilla\\_composition\\_and\\_vanillin\\_content.aspx](http://www.celkai.in/Crops/Spices/Vanilla/vanilla_composition_and_vanillin_content.aspx)
4. K. Nguyen, P. Barton, J.S. Spencer, "Supercritical carbon dioxide extraction of vanilla", *The Journal of Supercritical Fluids*, 4(1) (March 1991) 40-46.



扫一扫，关注沃特世微信

# Waters

THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.®

Waters, The Science of What's Possible, ACQUITY, ACQUITY UPC<sup>2</sup>, MassLynx, Viridis和MV-10 ASFE是沃特世公司的注册商标。ChromScope和OBD是沃特世公司的商标。其它所有商标均归各自的拥有者所有。

©2015年 沃特世公司。印制于中国。2015年7月 720005457ZH AG-PDF

沃特斯中国有限公司  
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 5999  
成都: 028 - 6765 3588  
香港: 852 - 2964 1800

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