

Journal of Chromatography A, 1131 (2006) 253–260

Simultaneous determination of riboflavin, pyridoxine, nicotinamide, caffeine and taurine in energy drinks by planar chromatography-multiple detection with confirmation by electrospray ionization mass spectrometry
薄层色谱多重检测技术同时测定功能饮料中的 VB₂、VB₆、VB₃、咖啡因和牛磺酸成分及 TLC/MS 结构验证

Mario Aranda, Gertrud Morlock

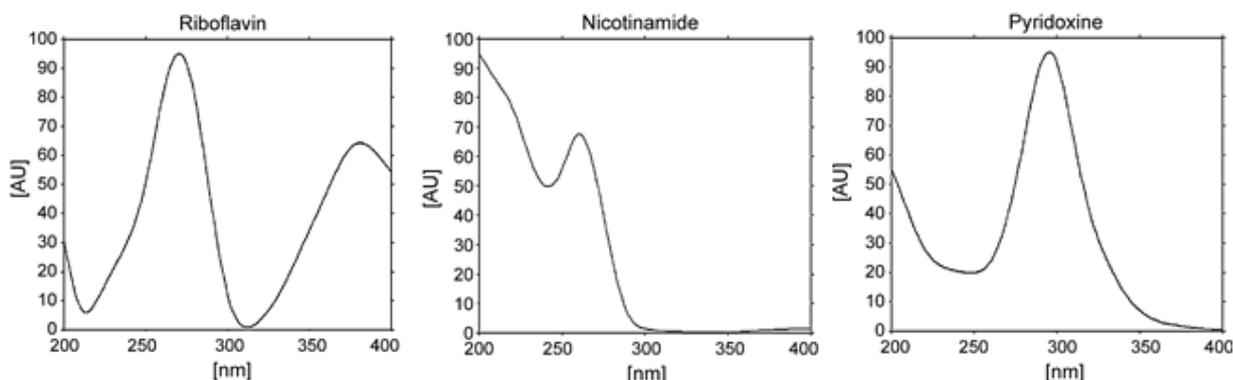
Institute of Food Chemistry, University of Hohenheim, Garbenstrasse 28, D-70599 Stuttgart, Germany

摘要

一种新开发的借助于 HPTLC 多重检测原理的高通量检测方法被用来同时对功能饮料（红牛™）中的核黄素（V_{B2}）、V_{B6}、V_{B3}、咖啡因及牛磺酸进行检测。10 批功能饮料及 6 批普通饮料的样品溶液经超声法制备，薄层展开后的图谱进行多波长扫描：（1）261 nm 和 275 nm 处分别对 V_{B3} 和咖啡因作紫外吸收检测；（2）分别于 366-400nm 范围和 313-340nm 范围内对 VB₂ 和 VB₆ 作激发荧光检测；（3）薄层板以水合印三酮衍生化显色后在 525nm 对牛磺酸进行可见光检测。工作曲线相关系数 $r^2 > 0.999$ 。5 种化合物 3 个浓度水平上的回收率试验结果在 80-106% 范围内，重复性试验 RSD 在 0.8-1.5% 之间。不同浓度水平中间精密度范围 V_{B2} 为 3.6-7.4%、V_{B3} 为 2.8-6.3%、咖啡因为 2.5-4.4%、牛磺酸为 2.1-2.9%、V_{B6} 为 0.5-4.0%。在正离子模式下以单级四级杆电喷雾质谱法对薄层板上成分进行结构验证，其中牛磺酸需要在负离子模式下进行。该方法简便可靠，为该类样品的常规分析提供了一种新的可替代方法。

结论

为了确保产品质量，业界需要快速、可靠且经济的检测方法，新的 HPTLC 方法为此提供了一种可信赖的高通量替代方法。借助于高效薄层色谱分析的强大灵活性，使得低成本的同时检测如功能饮料中的核黄素（V_{B2}）、V_{B6}、V_{B3}、咖啡因及牛磺酸等 5 类成分成为可能。这也是首次实现平行分离分析五种化合物并进行 HPTLC/MS 质谱验证，并通过 HPTLC 荧光检测对 V_{B6} 进行定量测定。



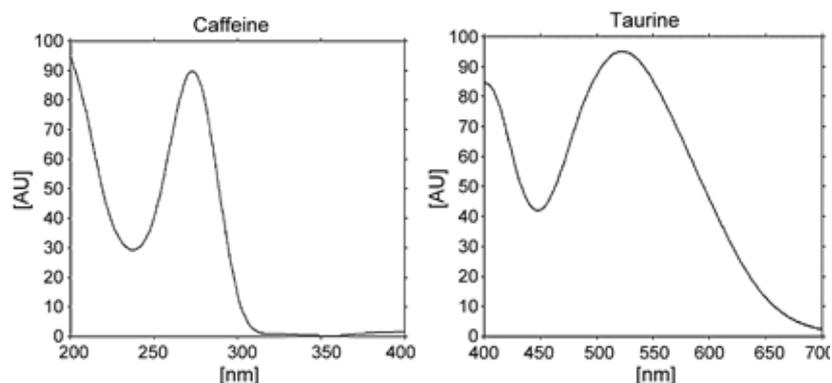


图 1 各成分的紫外/可见吸收光谱(硅胶 GF₂₅₄ HPTLC 薄层板)

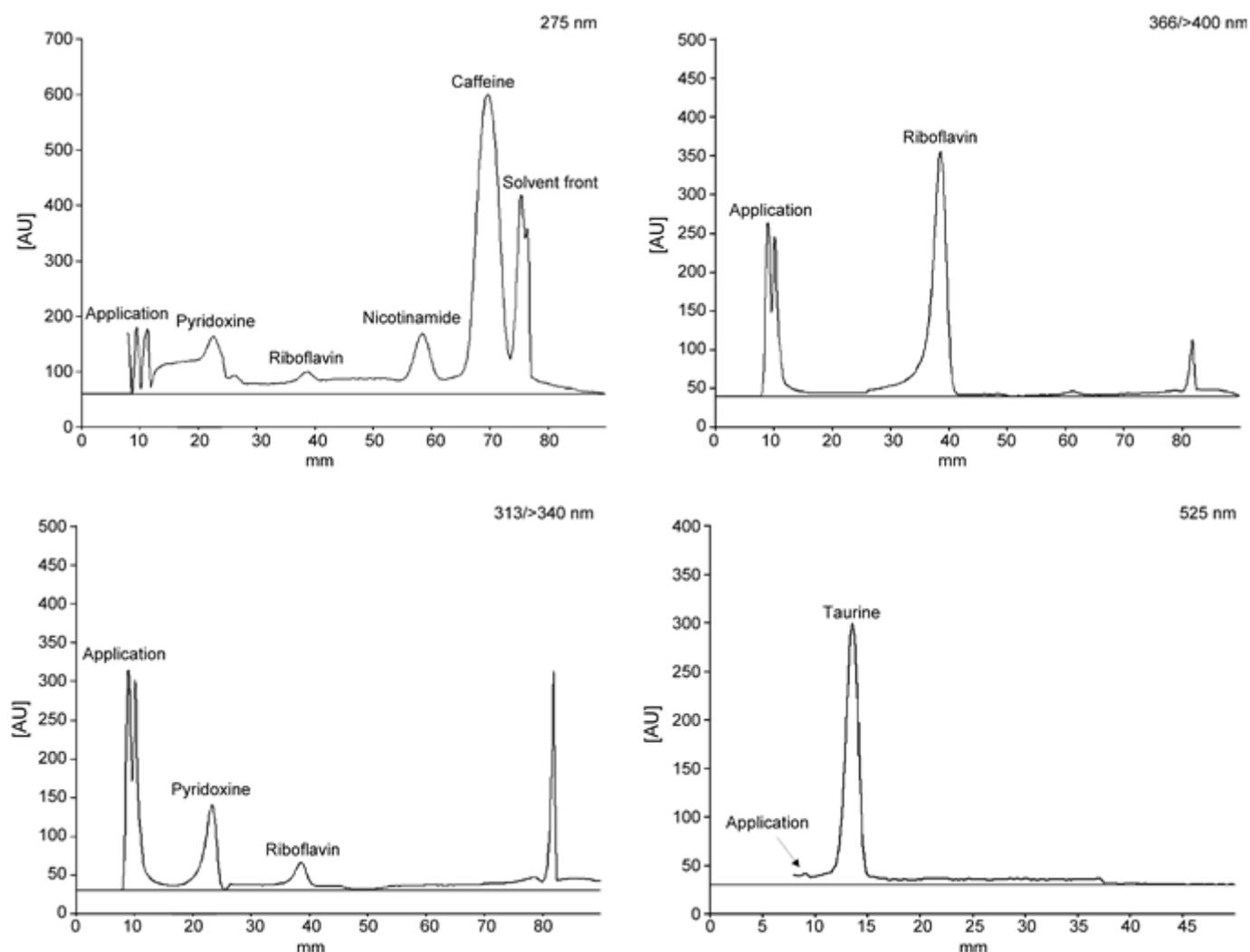
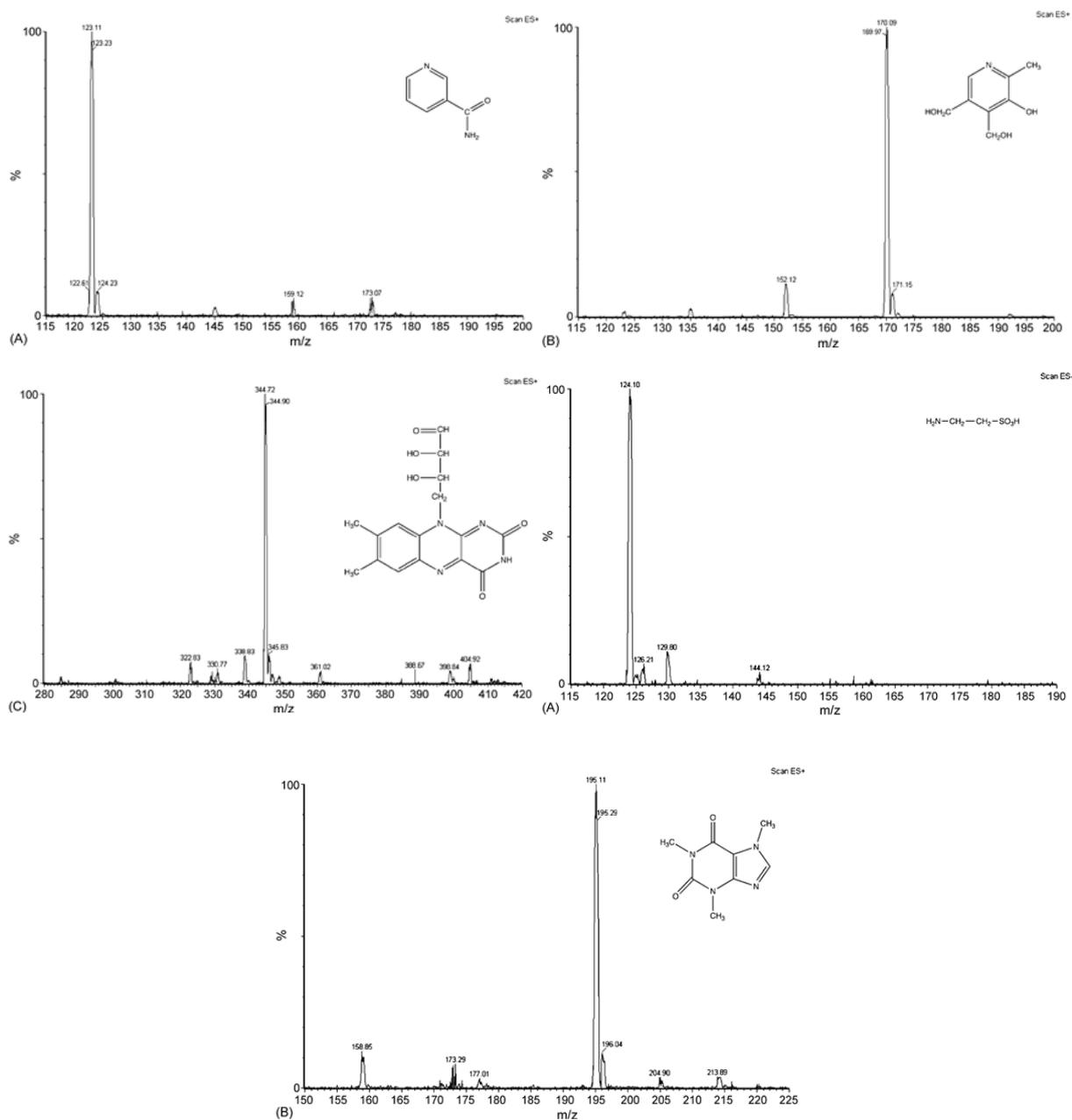


图 2 同一轨道样品多重检测扫描图(紫外光/可见光/荧光)

图 3 VB₂ (A)、VB₆ (B)、核黄素 (C) 牛磺酸 (D) 和咖啡因 (E) 的 HPTLC/ESI-MS 质谱图谱

Journal of Planar Chromatography 21 (2008) 6

HPTLC Coupled with Bioluminescence and Mass Spectrometry for Bioactivity-Based Analysis of Secondary Metabolites in Marine Sponges

HPTLC—生物自发光显影—质谱联用技术对海绵次生代谢产物的生物活性分析

Anne Kloppel, Wolfgang Grasse, Franz Brümmer, and Gertrud E. Morlock*

Institute of Food Chemistry, University of Hohenheim, Garbenstrasse 28, D-70599 Stuttgart, Germany

摘要

HPTLC—生物自发光显影—质谱联用技术快速分析可以快速检测未知样品中的生物活性物质，利用该方法，本研究从海绵中筛选新的生物活性成分。载有 12 个海绵甲醇提取物样品的薄层板在展开后，通过浸渍法使薄层板表面涂布上一层发光菌 (*Vibrio fischeri* 费氏弧菌) 溶液。如果化合物具有生物活性，会抑制细菌发光而在冷光背景下形成暗斑从而达到识别。与传统的物理 (吸收或激发荧光检测) 或化学 (微化学衍生化) 检测方法相比，这种微生物检测法可进一步探知新化合物。在筛选天然产物方面，这种活性导向的分析方法被证明较目标化合物分析方法相比具有显著的优势。为鉴定未知活性成分，HPTLC 系统与一台高分辨率质谱仪相连接，从而获得未知物精确的分子量。通过这种方法，一个由 *Vibrio fischeri* 提示的生物活性成分被鉴定为阿瓦醌 (Avarone) — 一个目前只在 *Dysidea avara* 海绵体内被发现的活性次生代谢产物。该方法无论是发现还是鉴别新的活性成分都被证明是非常有效的。

结论

在寻找新的天然产物的过程中，以海绵中发现和鉴别新的活性成分以为例，该方法都被证明是非常有效的。HPTLC 和生物自发光检测的联用技术，为从复杂的混合物中分离及鉴定具有潜在生物活性的物质提供了一种快速且经济的方法。该方法采用发光费氏弧菌的生物鉴定手段来确认从海绵中所分离化合物中活性成分的存在，单个的生物活性成分能够有选择性的且灵敏的得到甄别，它们会在在细菌的冷光背景下形成可见的暗斑或亮斑，这种活性导向的鉴别方法能够识别常规分析可能无法发现的潜在活性成分。

标准的生物监测方法，如 Mikrotox 生物测定，只能显示出可能含有多种活性物质的复杂混合物的总体活性，这些标准方法需要冗长繁琐的化合物单体的分离，以及接下来的各种分析以确定其生物活性。

相比之下，Bioluminex®生物自发光检测是一种研究化合物构效关系 (SAR) 的快速简便的方法，但同时需要注意化合物间的可能的协同效应。在同一块 HPTLC 薄层板上，最多可以平行地对 24 个不同的样品进行分析，比与之对应的柱色谱技术 (如 HPLC) 要快许多。样品中的大量基质干扰成分通常滞留于薄层板原点附近，不会对分离造成影响，但会富集于 HPLC 色谱柱内，因此 HPTLC 又消除了清洗色谱柱固定相或 SPE 净化带来的耗时问题，此外和 HPLC 方法相比，HPTLC 方法由于样品检测前所有溶剂都会挥发，因此不会造成酶或生物有机体失活的顾虑。

采用恰当的图像比对及数字化量化，TLC 不再仅仅是一种定性的方法。最值得关注的是对未知生物活性物质的阐明，并结合采用在线高分辨率质谱仪用来获取更多的结构信息。通过 CAMAG TLC-MS 样品萃取接口可快速的从待分析的薄层板上直接提取具有生物活性的成分斑点，可进一步利用傅立叶变换红外光谱仪

(FTIR) 或衰减全反射红外光谱仪 (FTIR-ATR) 进行结构分析。

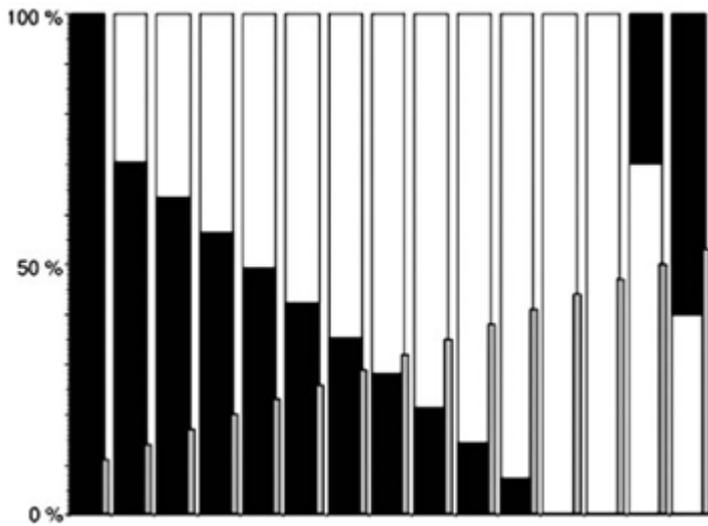


图 1 AMD2 梯度展开溶剂系统变化示意图(共 15 步)

黑色:甲醇 白色:二氯甲烷

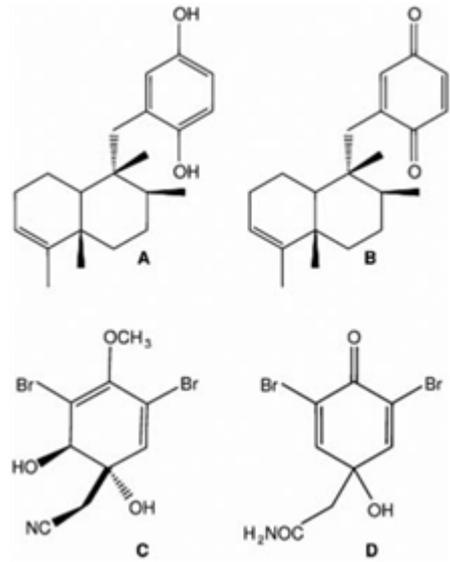


图 2 化合物结构式

A avarol; B avarone; C aeropylsinin-1; D dienon

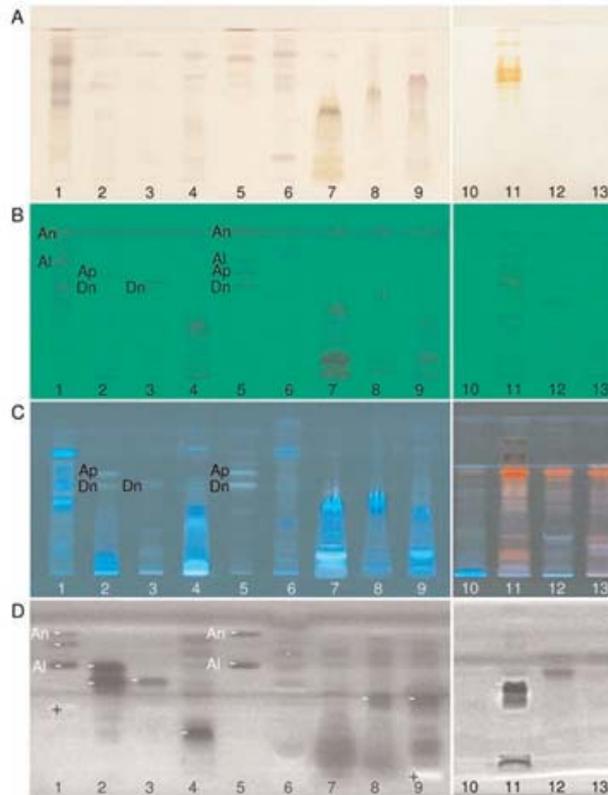


图 3 海绵甲醇提取物中生物活性代谢产物 TLC 图谱 (-代表冷光下抑制; +代表冷光下增强)

A 白光 (样品 1-9 经硫磺酸衍生化) B 254nm C 366nm D 生物自发光检测

- 1 *Dysidea avara*; 2 *Aplysina aerophoba*; 3 *Aplysina cavernicola*; 4 *Axinella damicornis*; 5 二烯酮、aeropylsinin-1、阿瓦醇及阿瓦醌混合标准品; 6 *Acanthella acuta*; 7 *Axinella polypoides*; 8 *Axinella cannabina*; 9 *Suberites domuncula*; 10 *Agelas oroides*; 11 *Crambe crambe*; 12 *Hemimycale columella*; 13 *Haliclona mediterranea*

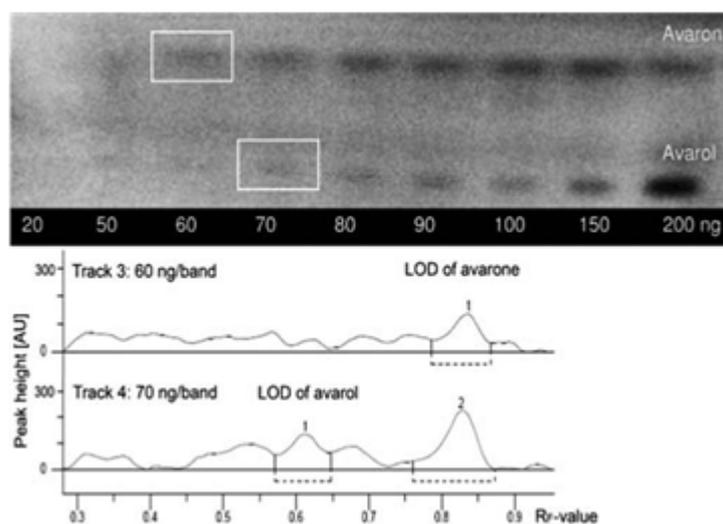


图 4 阿瓦醌(60ng)和阿瓦醇(70ng)的 HPTLC 生物自发光检测限与生物自发光信号比较

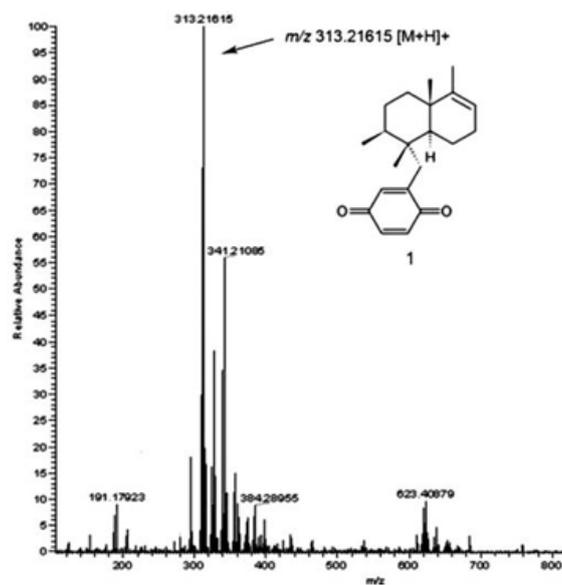


图 5 活性成分阿瓦醌正离子模式下 HPTLC-DART-LTQ XL 轨道离子阱的单同位素质谱图

Journal of Chromatography A, 1128 (2006) 244–250

Efficacy of planar chromatography coupled to (tandem) mass spectrometry for employment in trace analysis
薄层色谱串联质谱技术用于痕量分析的有效性研究

Ute Jautz, Gertrud Morlock*

University of Hohenheim, Institute of Food Chemistry, Garbenstrasse 28, D-70599 Stuttgart, Germany

摘要

即便是用于痕量分析,采用基于柱塞设计的提取设备联结的 HPTLC-MS 也被显示是一种适当的平面色谱量化技术,可重现的从硅胶固定相中提取微量成分 (pg 重量单位, 亿分之一克) 使这种技术区别于其它方式,其 MS 信号的重复性精度平均 RSD 为 12.5%, 如哈尔满 (Harman), 一种杂环芳族胺。同一块薄层板和不同板或不同时期的分析反应的确定系数分别为 0.9915 和 0.9488, 单级四极管的检测限 (LOD) 好于 40pg, 串联质谱的定量限 (LOQ) 好于 20pg。得到的 LOD/LOQ 参数和 HPLC/MS 报告中一样具有相同的重要性, 只是这种表示灵敏度的方法首次用于 HPTLC 电离质谱领域。

结论及展望

在成本效率上可以缩短样品制备过程,一次薄层展开后可进行多重检测及其机动性是平面色谱及重要特征,因此利用 HPTLC/ESI-MS 联用技术对薄层板固定相中明确的微量成分进行确认令人很感兴趣。由 Luftmann 设计的连接装置可以实现这一目标,它可以从硅胶固定相提取甚至是 pg 范围内的成分,并且保证 MS 信号的重复性精度及适当的分析相应值,研究表明这种新的连接技术可以广泛的应用与痕量分析,经证明,HPTLC/MS 可以达到和 HPLC/MS 相当的灵敏度。据我们所知,在这项研究中,灵敏的 ESI-MS 和 ESI-MS/MS 检测器首次在平面色谱领域中得以展示,同时,进一步的从牛奶、酸奶及脂肪中测定异丙基噻吨酮证明了该方法在痕量分析中的有效性。

在一分钟之内从薄层板上的指定位置得到灵敏的质谱信号是可能的,我们认为,HPTLC 和 MS 联结的独特优势是根据薄层板展开后各成分的分离情况而尽可能少的运用 MS 检测,因为量化后只有薄层板上明确的发现物才会通过 MS 去确认,并且并不是每次展开都需要这样做。

将来,在痕量分析中或许可以将 DART-TOF-MS 和 HPTLC 联用直接进行分析。初步的对 HPTLC/DART-TOF 联用的研究表明可以达到和上述相当的灵敏度,不过,分析相应值及重复性主要决定于薄层板在空气包围及大气压力下工作的离子源激发的气流中的定位。

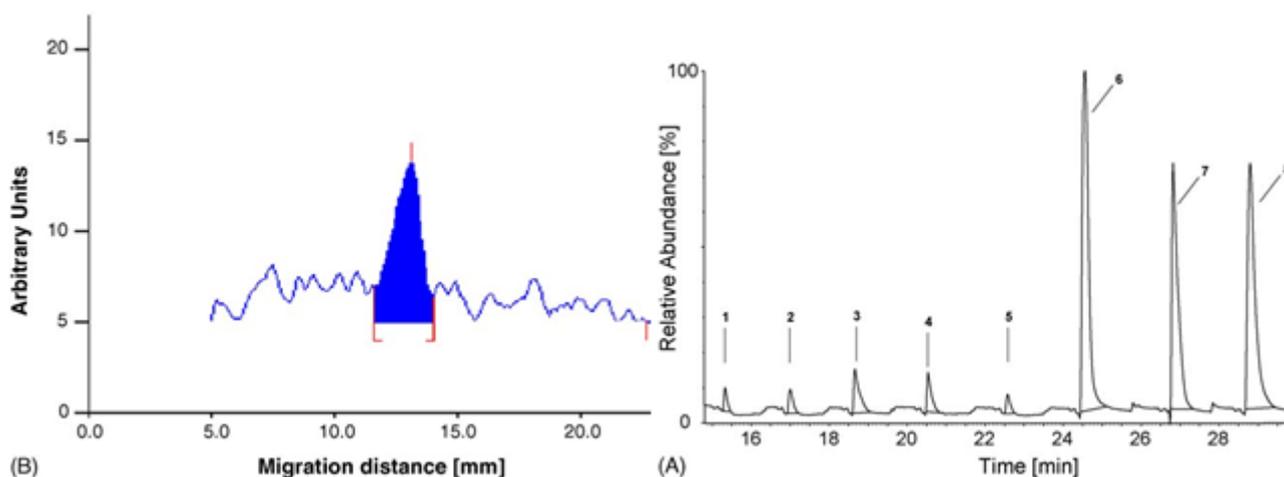


图 6 TLC-MS 与薄层扫描仪检测灵敏度比较图

A TLC-MS 质谱检测信号图 (1-5 为空白; 6-8 为哈尔满, 80ng) B TLC 薄层扫描图谱 (366 荧光, 80ng)

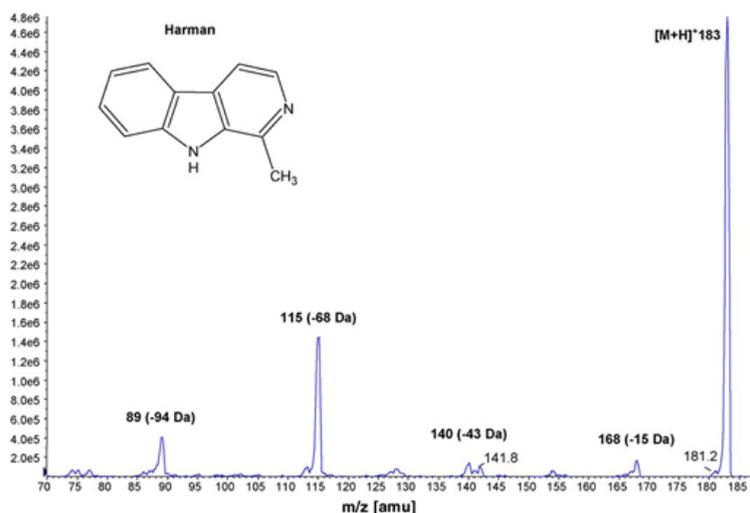


图 7 由 HPTLC/ESI-MS/MS 得到的哈尔满分子离子峰 $[M+H]^+$ ($m/z=183$) 的质谱扫描图谱

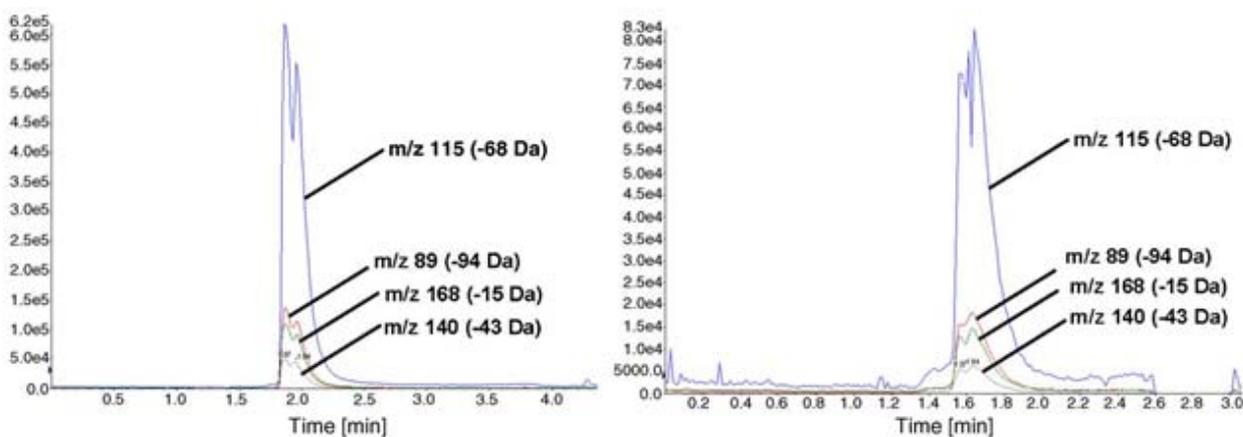


图 8 HPTLC/ESI-MS/MS 质谱图叠加生成的 $m/z115$, $m/z89$, $m/z168$ 和 $m/z140$ 离子碎片峰
左图显示 200 pg 哈尔满的 MS/SRM 洗脱曲线, 右图为 HPTLC 薄层上的 20 pg 洗脱曲线

Anal Bioanal Chem (2006) 385: 586 – 595

Determination of isopropylthioxanthone (ITX) in milk, yoghurt and fat by HPTLC-FLD, HPTLC-ESI/MS and HPTLC-DART/MS

高效薄层色谱结合荧光、电喷雾质谱、实时直接分析质谱测定牛奶、酸奶及油脂中异丙基噻吨酮的含量

Gertrud Morlock¹, Wolfgang Schwack

University of Hohenheim, Institute of Food Chemistry, Garbenstrasse 28, D-70599 Stuttgart, Germany

摘要

本文开发了两种新的 HPTLC 方法测定牛奶、酸奶及油脂样品中的异丙基噻吨酮（以下简称 ITX），方法用加速溶剂萃取仪（Accelerated solvent extraction, 简称 ASE），以环己烷与乙酸乙酯的混合溶剂提取牛奶及酸奶中的 ITX；以乙腈直接萃取大豆油及人造黄油中的 ITX。分别以硅胶 60 高效薄层板为固定相，甲苯-正己烷（4:1, v/v）为展开剂；RP18 反向高效薄层层板为固定相，乙腈-水（9:1, v/v）为展开剂，可将 ITX 和内标物 2,4-二乙基噻唑酮（2,4-Diethyl-9H-thioxanthen-9-one, 以下简称 DTX）分离。采用对应-平行的点样方法，在薄层板上下点样并先后展开，可在 7 分钟内完成 36 个样品的分离。方法采用 254nm（>400nm 的滤光片）下荧光扫描进行定量，ITX 与 DTX 在两种薄层板上的最低检测限（信噪比为 3）均为 64 pg，在含有油脂性基质（黄油）的样品中，最低检出限为 1 μg/kg。20-200 μg/kg 之间的多项式回归相对标准偏差为 ±1.51%（ $r=0.99981$ ），自最低定量限始，样品量与信号间呈良好的线性关系（ $s_{dv}=\pm 2.18\%$, $r=0.99893$ ）。重复性：32ng ITX 对照品在硅胶板上 9 次试验的变异系数（CV）为 1.1%，在反相板为 2.9%。含 ITX 分别为 20、50、100 μg/kg 的牛奶、酸奶、豆油和人造黄油样品的变异系数（ $n=4$ ）在 ±1.0-6.4% 之间。研究结果证明现代薄层色谱是一种测定奶质样品或油脂基质样品中 ITX 的快速、经济的可选方法。上述成功试验的结果可以同时采用在线电喷雾质谱（ESI/MS）（最低检测限 128 pg）与实时直接分析质谱系统（DRAT/MS）进行验证，这是高效薄层色谱的又一优势。本法 ITX 含量在 20、50、400 μg/kg 样品的全部平均回收率，牛奶为 41%、酸奶为 70%、人造黄油为 6%、大豆油为 12%，加入内标物校正后的回收率分别为牛奶 130%、酸奶 70%、人造黄油和大豆油 97%。

结论

常规薄层色谱技术的扫描定量曾被广泛应用，然而验证结果显示现代薄层色谱更适应于定量测定，可推荐为不同基质样品中 ITX 含量测定的备选方法。此外，得益于其大量的样品处理能力，本法具有快速、经济等众所周知的特点，如本实验中，仅 7 min 共 10ml 溶剂即可完成 36 个样品的分离，意味着每个样品仅需 0.2min、0.3ml 溶剂。由于成功应用了加速溶剂萃取仪，使得样品处理这个最费时的操作变得流畅。本文两种高效薄层色谱方法均得到了较好的实验结果，但相比之下，正向分离方式的重现性稍好、基质干扰少（带荧光的基质集中在原点）、易于与质谱联用、花费更少。本分析程序可应于快速测定其它食品中的外源性成分等类似问题。

Fig. 2 Track images showing the influence of different ASE extraction solvents (1–3) on chromatography due to co-extracting matrix of milk: **a** silica gel 60 HPTLC plate and **b** RP18 HPTLC plate: 1 acetonitrile, 2 cyclohexane/ethyl acetate (1:1, v/v) and 3 ethyl acetate

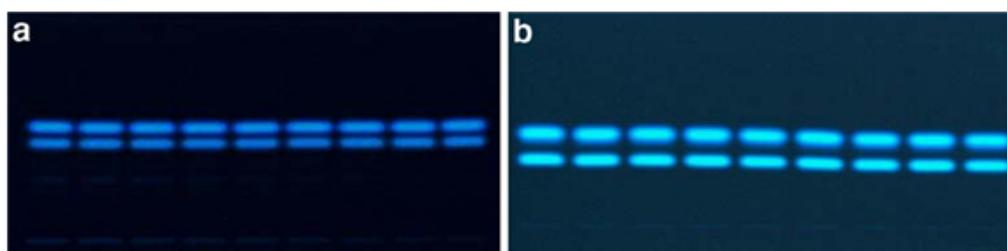
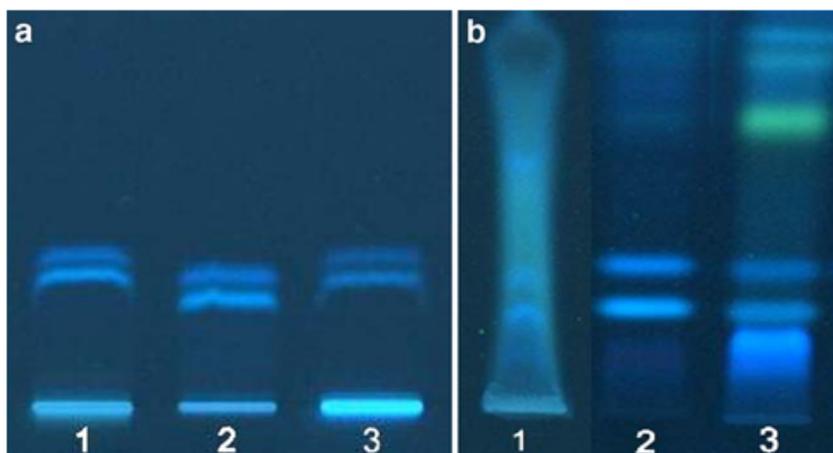
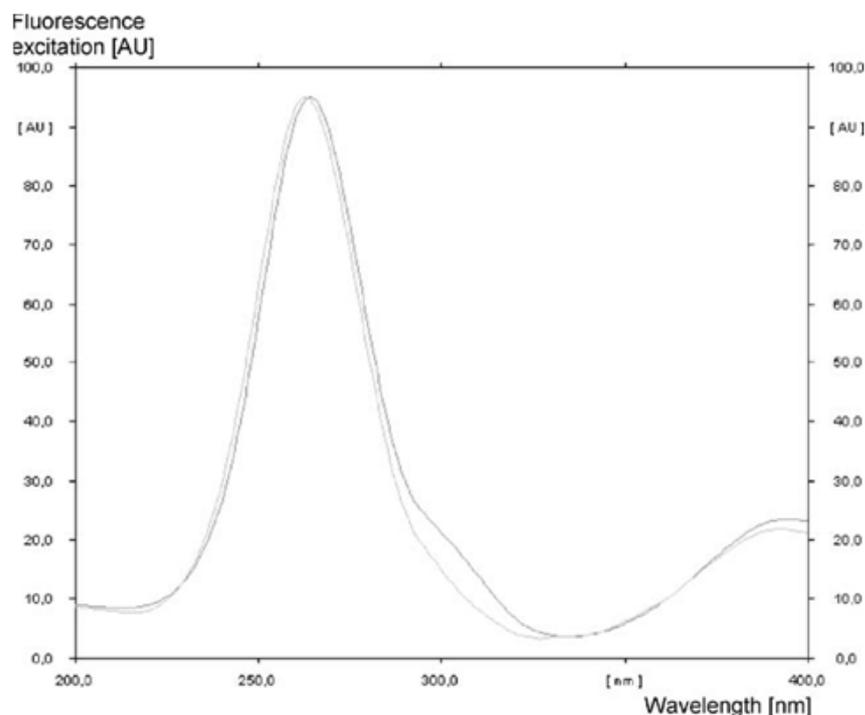


Fig. 3 Repeatabilities ($n=9$) of the planar chromatographic determination via fluorescence measurements at UV 254/>400 nm by illumination (reflectance) at 254/>400 nm: **a** silica gel 60 HPTLC plate, toluene/*n*-hexane (3:1, v/v), coefficient of variation was $\pm 1.1\%$

for both DTX (24 ng, hR_F 20) and ITX (32 ng, hR_F 26). **b** RP18 HPTLC plate, acetonitrile/water (9:1, v/v), coefficient of variation was $\pm 2.9\%$ for both DTX (32 ng, hR_F 25) and ITX (32 ng, hR_F 37)

Fig. 4 Fluorescence excitation spectra (200–400 nm) of ITX (pale-grey spectrum, 5 ng) and DTX (dark-grey spectrum, 14 ng) on a silica gel plate confirming the optimal irradiation wavelength of 254 nm for



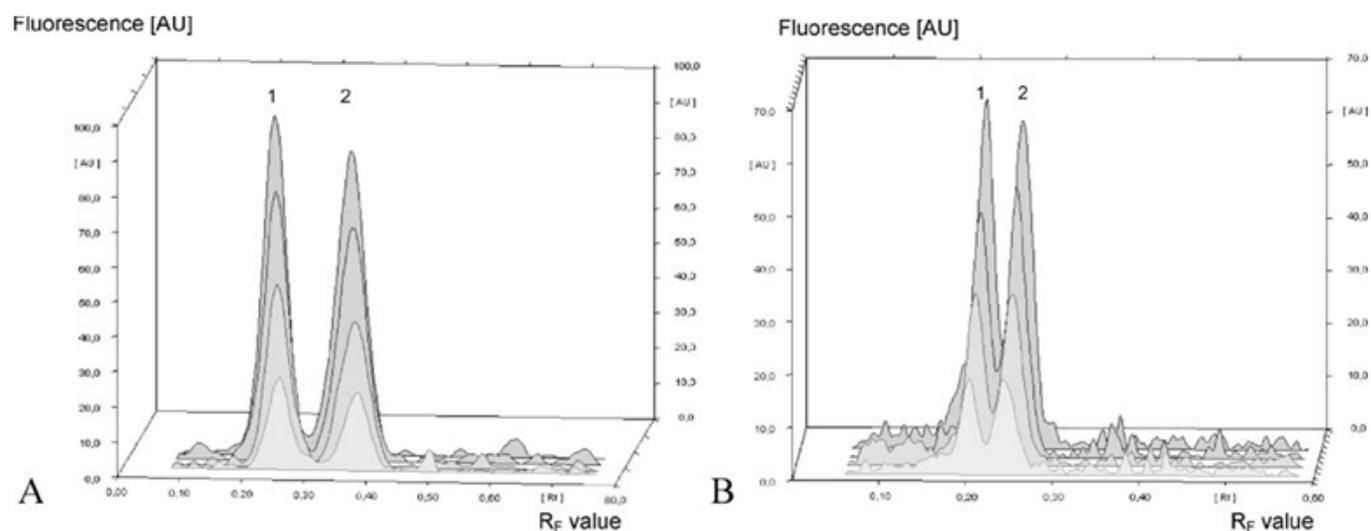


Fig. 6 Overlay of a track of 64 pg, 128 pg, 192 pg and 256 pg DTX (*peak 1*) and ITX (*peak 2*): **a** RP18 HPTLC plate, **b** silica gel 60 HPTLC plate; limits of detection (S/N of 3) for ITX and DTX were established to be 64 pg and slightly better on RP18 phases

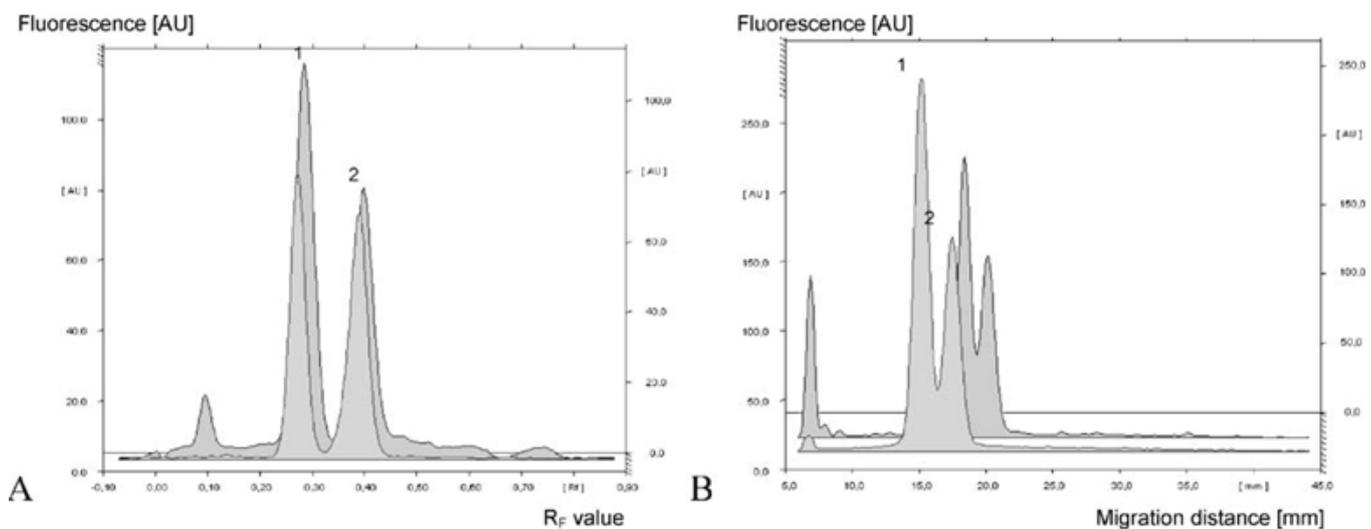


Fig. 7 Overlay of an ITX standard track (*red curve*) and a milk sample track (*blue curve*) spiked with DTX at $50 \mu\text{g kg}^{-1}$ (*peak 1*, internal standard) and ITX at $20 \mu\text{g kg}^{-1}$ (*peak 2*): **a** RP18 HPTLC plate, **b** silica gel 60 HPTLC plate (for chromatographic conditions see Fig. 3)

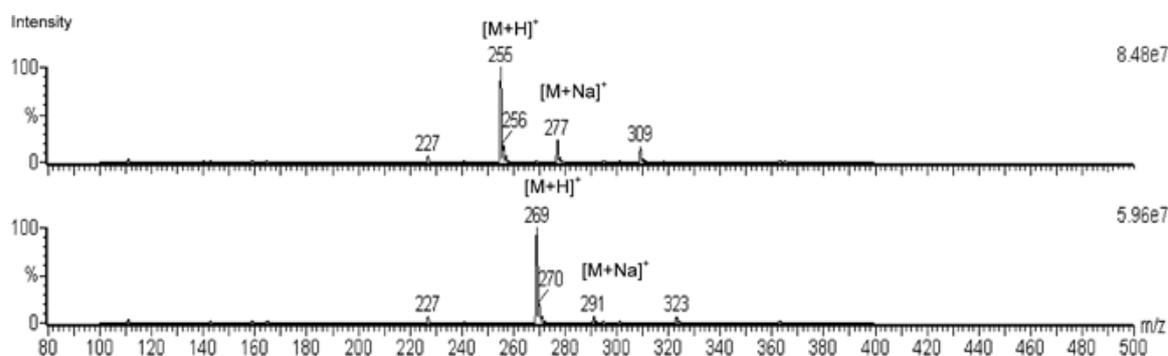


Fig. 8 Online mass spectra (ESI^+) of ITX (*top*) with $[\text{M}+\text{H}]^+$ at m/z 255 and $[\text{M}+\text{Na}]^+$ at m/z 277 and DTX (*bottom*) with $[\text{M}+\text{H}]^+$ at m/z 269 and $[\text{M}+\text{Na}]^+$ at m/z 291, both at $1 \mu\text{g}$ on silica gel plates

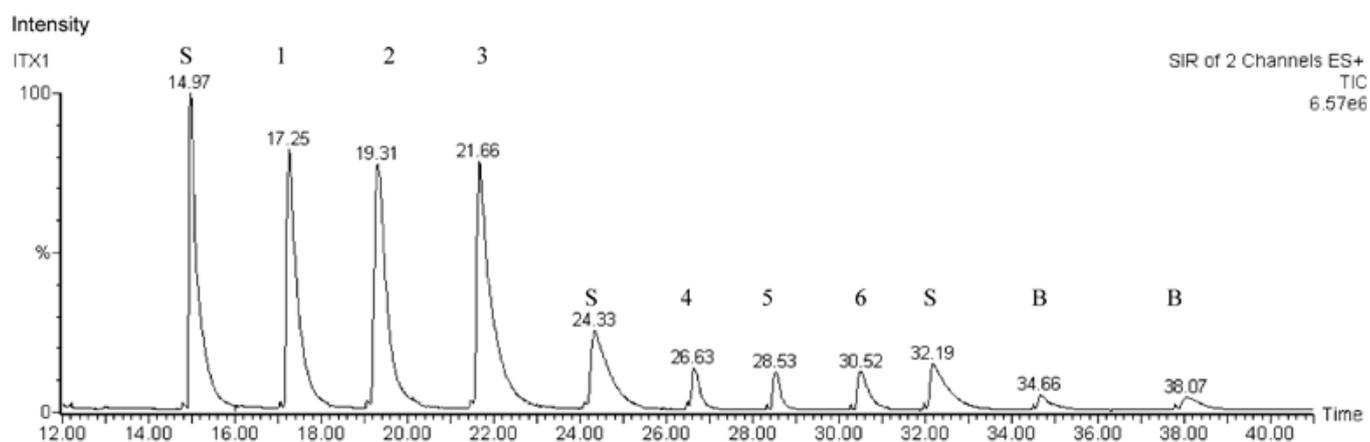


Fig. 9 Elution profile of 3 ITX zones of a yoghurt sample spiked at $100 \mu\text{g kg}^{-1}$ (peaks 1–3) and $20 \mu\text{g kg}^{-1}$ (peaks 4–6) recorded in the SIM mode at m/z 255 and 277 besides extractions of standards zones (S) and blank extractions (B)