

安捷伦液相色谱 在食品分析中的应用



Agilent Technologies

序言

中国有句名言，叫作“民以食为天”。

食品，包括常规食品和特殊食品，不仅是关系人们生存质量的必需品，同时也是关系人们生活质量的消费品。然而，近来，食品这一生活中必不可少的物质竟也威胁着人们的安全与健康。经常发生有毒有害物质污染了人们生活必不可少的食品。因此，如何保证食品的安全是一项关系到人们生活质量，甚至是安全的重要任务。

经济一体化，食品国际化。中国已经成为了WTO的一员，中国食品将与国际接轨，与其说是机遇不如说是挑战。所以，在某种意义上，关注食品的安全，就是关注中国的发展。

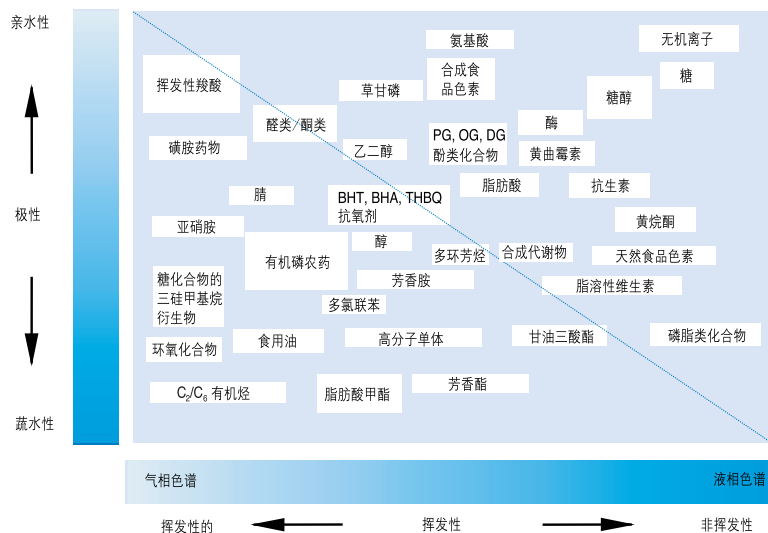
许多国家，尤其是发达国家，已经制定了越来越严格的法规来限定食品中化学添加剂，残留化合物，污染物等物质的含量。这些规定的实际以保证上述添加剂不超过一定的限量。对于食品检测水平的高低，在很大程度上取决于分析技术的水平。随着分析技术的发展，食品分析有了很大的提高。为了检测食品中是否含有有毒有害物质，以及这些物质是否超标，必需发展合适的分析方法来满足法规的要求。

在食品分析中，高效液相色谱被广泛地用于食品中目标化合物的分离及检测。液相色谱将一个复杂的混合物分离，然后选择不同类型的检测器，如紫外，质谱等进行检测。液相色谱适合分析热不稳定，非挥发性及极性化合物。

安捷伦科技一直致力于分析技术及应用的开发。在色谱分析领域安捷伦一直是技术与应用的领导者。

在本应用文集中，分为两个部分。第一部分是食品分析举例。每一个分析，都包含了色谱图，分析条件及仪器配置。第二部分介绍了液相色谱的原理及样品制备方法。

我们希望借此应用文集能给广大的用户在食品分析方面提供一个参考，并且能为用户提供一个分析解决方案。



目录

第一部分 高效液相色谱法

第1章 食品添加剂的分析举例

酸化剂	2
抗氧化剂	4
防腐剂	6
人工甜味剂	8
着色剂	10
香料分析	12
香料	12
苦味化合物分析: 橘皮苷和4,5,7三羟基黄酮	14

第2章 食品添加剂

化学治疗药物及抗寄生虫药物残留的检测	16
四环素分析	18
烟曲霉素分析	19
霉菌毒素的分析	21
双酚 A 二环氧丙醚分析	24
农药分析	26
氨基甲酸酯	28
草甘膦	29

第3章 食品中天然化合物的分析

无机阴离子分析	32
油脂分析(Lipids)	35
通过甘油三酸酯的分析可以鉴定脂肪和油是否有掺假 以及在处理过程中甘油三酸酯是否有变性	35
橄榄油中的甘油三酸酯分析	37
脂肪酸分析	38
糖类化合物分析	40
维生素分析	42
水溶性维生素	42
脂溶性维生素的分析	45
用正相色谱分析维生素 E	46
生物胺分析	48
氨基酸分析	50
多肽的分析	52

第二部分 分析仪器基础

第4章 液相分离

分离原理	58
反相色谱	58
离子-交换色谱	58
体积-排阻色谱	59
吸附基质	59
窄径色谱柱的来临	59
柱温对分离效率的影响	60

第5章 样品制备方法

样品制备过程	62
自动化	62
固体	63
超声波萃取	63
蒸馏	64
超临界萃取	64
液体	65
液-液萃取	65
固相萃取	65
凝胶过滤色谱	66
保护柱	67

第6章 进样技术

一个好的进样装置应具有的特点	70
手动进样器	71
自动进样器	72
可以进行样品预处理的自动进样器	72
化学衍生化	73

第7章 流动相泵和脱气机

现代液相色谱泵的特点	76
流量范围	76
梯度洗脱	76
在高压下形式的梯度	77
低压梯度混合	77

用梯度的泵设计	78
低压混合梯度泵	78
高压梯度泵(安捷伦 1100 泵系列)	80
脱气	82
氦气脱气	83
真空脱气	84
第 8 章 检测器	
分析参数	87
检测限和定量限	87
选择性	87
线性	88
定性信息	88
紫外检测器	89
二极管阵列检测器	90
三维数据	91
荧光检测器	95
截止滤光片	96
信号谱图模式	96
在线谱图测量和多信号采集	96
多信号	97
电化学检测器	98
电极材料	99
流通池外观	99
自动化程序	100
质谱	101
API 接口	102
示差(折光)检测器	104

第9章 衍生化	
添加紫外-可见发色团	108
荧光标记的添加	109
柱前还是柱后衍生?	109
自动衍生	110
第10章 数据采集和处理技术	
条带图形记录仪	112
积分仪	113
个人计算机	114
局域网	117
网络数据处理系统	118
第11章 决定HPLC性能的因素	
检测限(LOD)和定量限(LQD)	121
准确度和精密度	122
定性信息	123

高效液相色谱

第一部分

高效液相色谱
在食品分析中的
应用举例



第 1 章

食品添加剂 的分析举例





酸化剂

山梨酸和柠檬酸是两种最常用的食品酸化剂或防腐剂。醋酸、丙酸、琥珀酸、脂肪酸、乳酸、反丁烯二酸、苹果酸、酒石酸和磷酸，也都可以作为酸化剂。在现代食品加工过程中，酸化剂被用于多种用途，例如，柠檬酸可以增加食品的清香及酸味，而琥珀酸可以使食品有碱味和苦味。除了能使食品更加可口及诱人之外，酸化剂还可以用于：

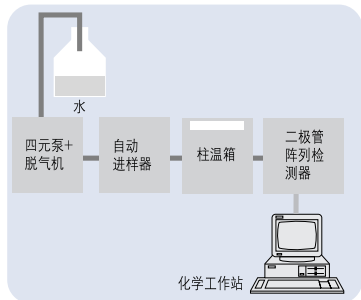
- 香味剂用于增强食品的味道，掩盖异味。
- 缓冲液用于调节 pH 值。
- 防腐剂防止食品在存放时细菌生长
- 抗氧化剂的增效剂防止食品腐烂变色
- 烘烤食品的粘度改进剂
- 用于奶酪和硬糖果类食品的熔点改进剂
- 肉类食品的腌制剂以增加食品的色香味。

样品制备

根据样品的基质情况，选择合适的样品净化过程。但是一般来说，蒸馏和固相萃取技术是必不可少的。

色谱条件

高效液相色谱二极管阵列紫外检测器或质谱(HPLC-UV-DAD或HPLC-MS)可以用来分析葡萄酒和伏特加酒中的柠檬酸。保留时间和光谱数据可以用来定性分析。



样品制备	过滤
色谱柱:	300 x 7.8 mm BioRad HP x 87-H, 9 μm
流动相:	0.0035 M H ₂ SO ₄
等梯度:	0.6 ml/min
柱温:	65°C
进样体积:	10 μl
检测器:	UV-DAD 192 nm OR 210 nm

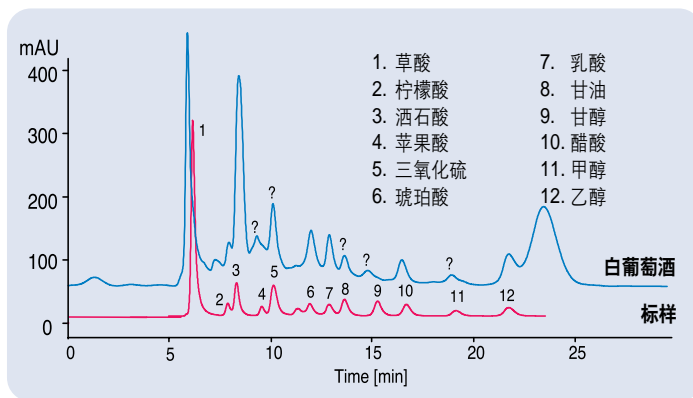


图 2
白葡萄酒中的酸化剂分析

条件与上面相同, 除了	
流动相:	0.007 M H ₂ SO ₄
等梯度	
检测器:	UV-DAD

高效液相色谱方法评价

检测限: 100 ng 注射量, 信/噪
比 = 2, 相当于浓度为
2 ppm 进样体积 50 μl

重复性:
10 次进样的保留时间 < 0.1 %
重复性相对偏差(RSD)
10 次进样的峰面积重 < 3%
复性相对偏差(RSD)

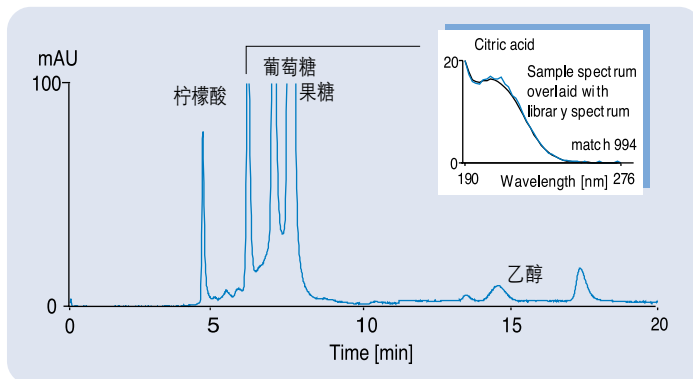


图 3
伏特加酒中柠檬酸分析



4. *Official Methods of Analysis, Food Compositions; Additives, Natural Contaminants*, 15th ed; AOAC: Arlington, VA, 1990, Vol. 2.; Official Method AOAC 986.13: quinic, malic, citric acid in cranberry juice cocktail and apple juice.



抗氧化剂

下面所列的是食品中的常用的抗氧化剂：⁴

天然抗氧化剂：

- 维生素 C
- 维生素 E

合成抗氧化剂

- 2,6—二叔丁基苯甲酚(BHT)
- 丁化羟基茴香醚(BHA)
- 单一叔丁基—丁基氢醌(TBHQ)
- 2、4、5—三羟基丁酰苯(THBP)
- 没食子酸丙酯(PG)
- 没食子酸辛酯(OG)
- 没食子酸二酯(DG)
- 4—羟基甲基—2,6—二(叔丁基)苯酚(Iono × -100)
- nordihydroguaiaretic acid (NDGA)
- 3,3—硫化丙二酸(TOPA)
- 棕榈酸抗坏血酸酯(ACP)

抗氧化剂可以是在食品中自然存在的，或者在食品加工过程中产生的，例如烟熏制品。天然的抗氧化剂包括生育酚(维生素E)和抗坏血酸(维生素C)。第二类抗氧化剂包括人工合成的抗氧化剂。当这些抗氧化剂加到食品中之后，它们可以通过阻止脂肪的氧化降解，从而大大延迟了食品开始腐烂的时间。在大多数国家，允许在食品中添加单一或复合抗氧化剂，但是对于这些抗氧化剂有一个最高限量。

样品制备

样品制备步骤完全取决于所测食品的基质情况。对于低脂肪的样品，超声波液—液萃取方法就可以。对于复杂基质的样品，须采用固相萃取，液—液萃取，或蒸馏等技术。

色谱条件

高效液相色谱—紫外可见光的二极管阵列检测器方法已被广泛地应用于食品中抗氧化剂的检测。下例为口香糖中抗氧化剂的分析。以保留时间和光谱图为定性依据。

样品制备:	超声波乙腈萃取法
色谱柱:	100 x 4 mm BDS, 3 μ m
流动相:	A = 水 + 0.2 ml H_2SO_4 , pH = 2.54 B = 乙腈
梯度洗脱:	起始 10 % B, 在 3 分钟 60 % B 在 4 分钟 80 % B 在 11 分钟 90 % B
流速:	0.5 ml/min
后运行时间:	4 分钟
柱温:	30°C
进样体积:	5 μ l
检测器:	UV-DAD, 检测波长 260/40 nm 参比波长 600/100 nm

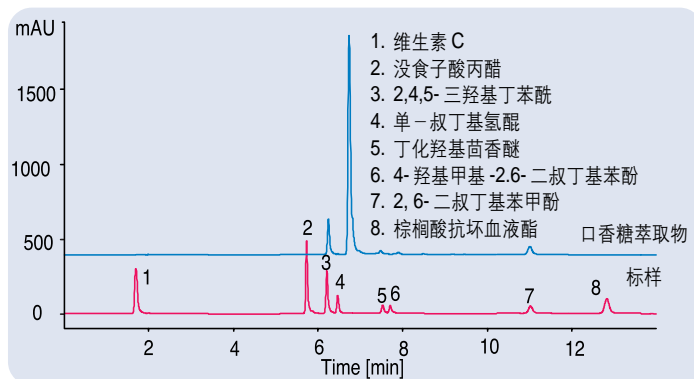


图 4
口香糖中抗氧化剂分析

高效液相色谱评价

检测限 0.1 - 2 ng (进样量),
S/N = 2

重复性:
10 次进样, 保留时间重 < 0.2 %
复性, 相对偏差(RSD)
10 次进样, 峰面积重复 < 1 %
性, 相对偏差(RSD)



4. *Official Methods of Analysis, Food Compositions; Additives, Natural Contaminants*, 15th ed; AOAC: Arlington, VA, **1990**, Vol. 2.;
AOAC Official Method 983.15: Antioxidants in oils and fats.



防腐剂

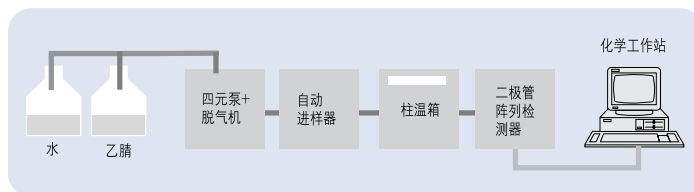
食品中常用的防腐剂如下所列：

- 苯甲酸
- 山梨酸
- 丙酸
- 对羟基苯甲酸甲酯，乙酯和丙酯⁴

食品中防腐剂的作用是防止食品和饮料中微生物的生长。根据食品的类型和可能的生成的微生物，选用合适的防腐剂。对羟基苯甲酸酯是最常用的防腐剂。在果汁中，除了二氧化硫，山梨酸和苯甲酸也可以用作防腐剂，防腐剂可以单独使用或复合使用。

样品制备

分析样品的制备完全根据被分析样品的基质情况而定。对低脂肪的样品，超声波液-液萃取即可。对于复杂基体的样品，须采用固相萃取，液-液萃取以及蒸馏等技术。



液相色谱的条件

高效液相色谱—紫外光谱检测器(HPLC-DAD)已被广泛地用于食品中的防腐剂检测。以下的例子,就是白葡萄酒和色拉酱中的防腐剂检测。以保留时间及光谱图为定性依据。

样品制备:	对于色拉酱,用 Carrez 法去除及过滤。对于白葡萄酒直接分析
色谱柱:	125 x 4 mm, Hypersil BDS, 5 μ m
流动相:	A = 水 + 0.2 ml H_2SO_4 , pH = 2.3 B = 乙腈
梯度:	起始 10 % B 在 3 分钟 60 % B 在 4 分钟 80 % B 在 6 分钟 90 % B 在 7 分钟 10 % B
流速:	2 ml/min
后运行时间:	1 分钟
柱温:	40 $^{\circ}C$
进样体积:	2 μ l
检测器:	UV-DAD, 检测波长 260/40 nm

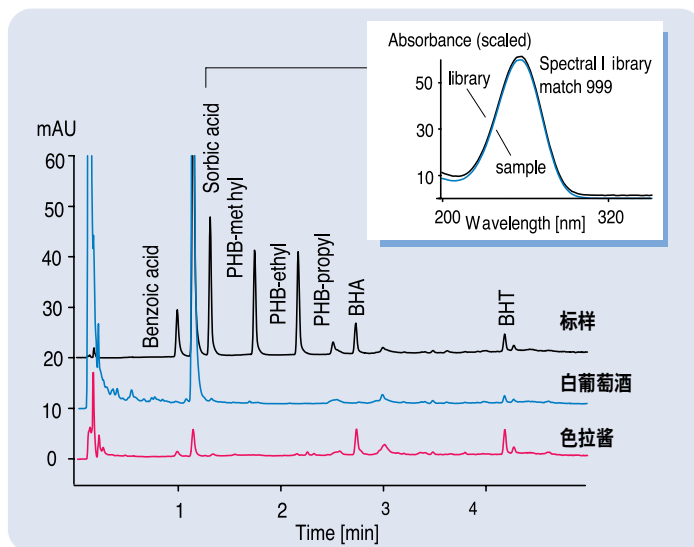


图 5
白葡萄酒和色拉酱中防腐剂的 analysis

高效液相色谱方法评价

检测限:	10 ppm, S/N = 2
重复性:	
10 次进样, 保留时间	< 0.1 %
相对偏差(RSD)	
10 次进样, 峰面积	< 3 %
相对偏差(RSD)	



4. Official Methods of Analysis, Food Compositions; Additives, Natural Contaminants, 15th ed; AOAC: Arlington, VA, 1990, Vol. 2.; AOAC Official Method 979.08: Benzoate, caffeine, saccharine in carbonated beverages.



人工甜味剂

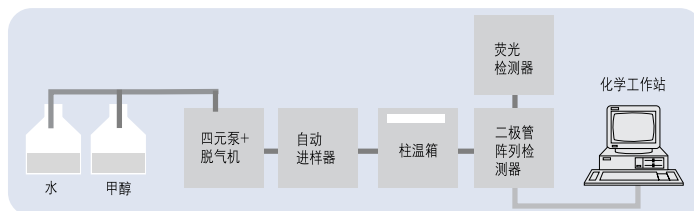
下列所述的化合物可以用于食品中的人工甜味剂。

- acesulfam
- 天冬酰苯丙氨酸甲酯
- 糖精

现在，低热甜味剂已广泛地被用于食品和饮料中。对这些化合物的毒性的研究使得人们关注到这些人工甜味剂对人是否安全可靠。为了防止摄入过量，已有法规限制人工甜味剂在食品和饮料中的含量。

样口制备

样品的净化完全根据被分析样品的基质情况而定。对低脂肪的样品，在低pH值条件，超声波萃取法即可。对于较复杂的基体的样品，须采用固相萃取，液/液萃取或蒸馏法。



液相色谱条件

高效液相色谱法用于天冬酰苯丙氨酸甲酯的分析。整个方法是由柱上在线衍生化，反相色谱分离，紫外检测组成。除了保留时间之外，紫外光谱数据也用来辅助定性之用。

衍生化试剂: 邻苯二醛(OPA)
巯基丙酸(UPA)

色谱柱: 100 x 2.1 mm,
Hypersil ODS, 5 μ m

流动相: A = 0.01 mm
醋酸铵
B = 甲醇

梯度洗脱: 起始 5 % B
在 5 分钟 25 % B
在 10 分钟 35 % B
在 13 分钟 55 % B
在 18 分钟 80 % B
在 20 分钟 95 % B

流速: 0.35 ml/min

后运行时间: 5 分钟

柱温: 40°C

进样体积: 1 μ l

柱前衍生化程序

1. Draw 5.0 μ l from vial 3 (borate buffer)
2. Draw 0.0 μ l from vial 0 (water)
3. Draw 1.0 μ l from vial 1 (OPA/MPA)
4. Draw 0.0 μ l from vial 0 (water)
5. Draw 1.0 μ l from sample
6. Mix 7 μ l (6 cycles)
7. Inject

检测器:

UV-DAD: 检测波长
338/20 nm

荧光检测器: 激发波长
230 nm
发射波长
445 nm

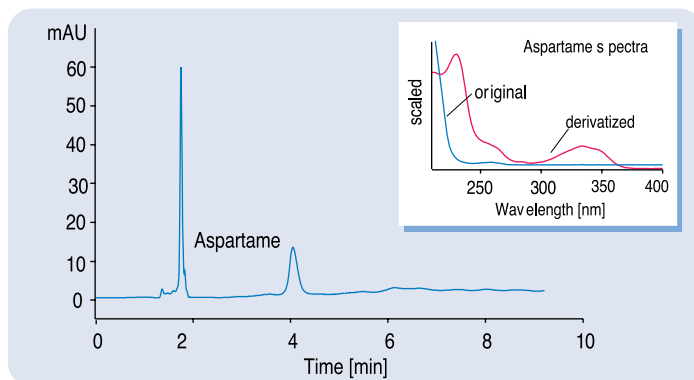


图 6

高效液相色谱方法评价

检测限:

荧光检测器: 200 pg(进样量)
S/N = 2

紫外—二极管阵列: 1 ng (进样量)
S/N = 2

重复性:

10 次进样, 保留时间 < 0.1 %

相对偏差(RSD)

10 次进样, 峰面积相对偏差(RSD) < 5 %



5. A.M. Di Pietra et al., "HPLC analysis of aspartame and saccharin in pharmaceutical and dietary formulations"; *Chromatographia*, **1990**, *30*, 215-219.

4. *Official Methods of Analysis, Food Compositions; Additives, Natural Contaminants*, 15th ed; AOAC: Arlington, VA, **1990**, Vol. 2.; Official Method AOAC 979.08: *Benzoate, caffeine, saccharin in soda beverages*.



着色剂

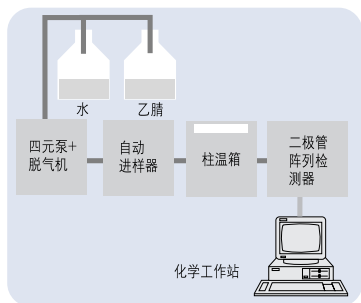
本文以食品着色剂 E104 喹林黄和 E131 专利蓝为应用分析举例。合成着色剂已被广泛地用于食品加工过程中，药物生产中，和化学工业中。

- 覆盖已变色食品的表面颜色
- 对食品重新上色
- 掩盖由于食品表面老化而产生的颜色。

由于法规对食品中着色剂的限量要求和对其付产物的质量控制的要求迫使人们开发可靠的分析方法来检测食品中的着色剂。现在，离子对反相液相色谱和离子交换色谱是最常用的分析方法。其中紫外检测方法是比较适合的方法。着色剂的最大紫外可见光吸收具有极其高的特异性。黄色的最大吸收波长为 400 nm，红色的最大吸收波长为 500 nm，绿色蓝色和黑色的最大吸收波长为 600–700 nm。若要进行所有着色剂的分析，检测器的输出光的波长范围应该覆盖整个波长范围（从紫外到可见光）。但是这种分析要求对于一般单灯检测器是不可能完成的。因此，必须选择配有双灯，即氙灯和钨灯的紫外–可见光二极管阵列检测器。这种检测器可以保证在整个波长范围内，都具有很高而稳定的光能量输出。

样品制备

对于混浊样品，需要过滤处理，对于固体样品需要用含 0.1% 的氨水的 50% 乙醇水溶液进行处理，然后进行离子净化。萃取过程采用被称为毛纤维的方法来进行(wool-Fiber)。着色剂经过脱附和过滤，溶液进样到高效液相色谱中进行分析。



色谱条件

下列的举例是利用离子对反相液相色谱分析染料成份。紫外光谱图用于结构的辅助确认。

样品制备:	进样而无需进一步的处理
色谱柱:	125 x 3 mm, Hypersil BDS, 3 μ m
流动相:	A = 0.01 M 磷酸二氢钠 + 0.001 M 磷酸四丁基二氢铵, pH = 4.2 B = 乙腈
梯度洗脱:	起始 15 % B 在 10 分钟 40 % B 在 14 分钟 90 % B 在 19 分钟 90 % B 在 20 分钟 15 % ACN
停止时间:	20 分钟
后运行时间:	4 分钟
流速:	0.8 ml/min
柱温:	40°C
进样体积:	1 μ l
检测器:	UV-DAD 信号 A: 254/50 nm (for optimization of separation) 信号 B: 350/20 nm 信号 C: 465/30 nm 信号 D: 600/40 nm

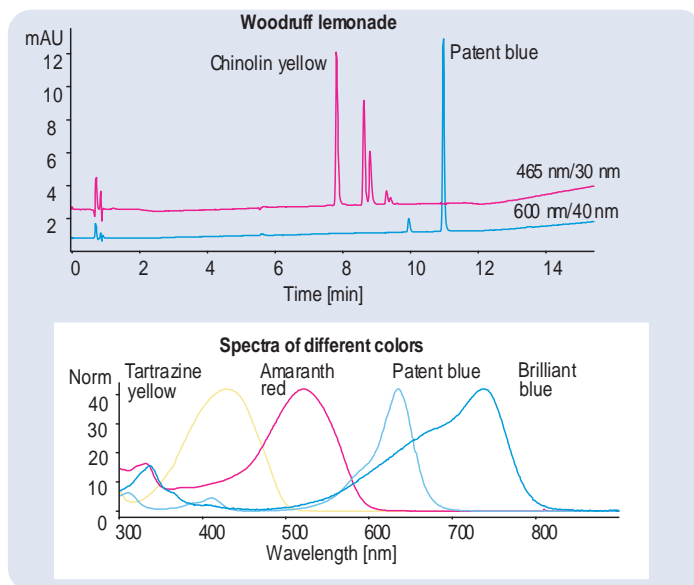


图 7
柠檬汁中的合成着色剂分析。黄色，红色，蓝色和黑色的光谱图的叠加图

高效液相色谱方法评价

检测限:	2 ng(进样量), (对于 UV-DAD)	S/N = 2
重复性:	10 次进样, 保留时间	< 0.2 %
的相对偏差	10 次进样, 峰面积的	< 3 %
相对偏差		



4. *Official Methods of Analysis, Food Compositions; Additives, Natural Contaminants*, 15th ed; AOAC: Arlington, VA, 1990, Vol. 2.; Official Method AOAC 981.13: Cresidine sulfonic acid in FD&C Red No. 40; Official Method AOAC 982.28: Intermediates and reaction by-products in FD&Y Yellow No. 5; Official Method AOAC 977.23: 44' (Diazoamino) dibenzene sulfonic acid (DAADBSA) in FD&C Yellow No. 6; Official Method AOAC 980.24: Sulfanilic acid in FD&C Yellow No. 6. 6. A.G. Huesgen, R.Schuster, "Sensitive analysis of synthetic colors using HPLC and diode-array detection at 190-950 nm", *Agilent Application Note 5964-3559E*, 1995.



香料分析

下面所列的化合物是用于食品中的香料。

- 蛇麻酮的洒花酮(蛇麻草中的苦味剂)
- 香草
- 4,5,7-三羟基蒸烷酮和橘皮苷(有苦味的化合物)

以上三种化合物被用于食用油，有苦味和辣味的食品中。虽然目前气相色谱对于香料的分离分辨率是最好的，但是液相色谱对于低挥发性或热不稳定的化合物的分析是非常合适的。

香料 样品制备

混浊样品需要过滤，而固体样品须用乙醇萃取。经过过滤之后，清液进样到液相中进行分析。



样品制备: 直接进样
 色谱柱: 100 x 4 mm,
 Hypersil BDS, 3 μ m
 流动相: A = 水 + 0.05 ml
 硫酸(浓), pH = 2.3
 B = 乙腈
 梯度洗脱: 起始 10 % B
 在 3 分钟 40 % B
 在 4 分钟 40 % B
 在 6 分钟 80 % B
 在 7 分钟 90 % B
 流速: 0.8 ml/min
 后运行时间: 3 分钟
 柱温: 30°C
 进样体积: 5 μ l
 检测器: UV-DAD
 检测波长: 280/80 nm
 参比波长: 360/100 nm

色谱条件

利用反相色谱分析香草中的香料成份。紫外光谱图可以用于辅助的定性分析。

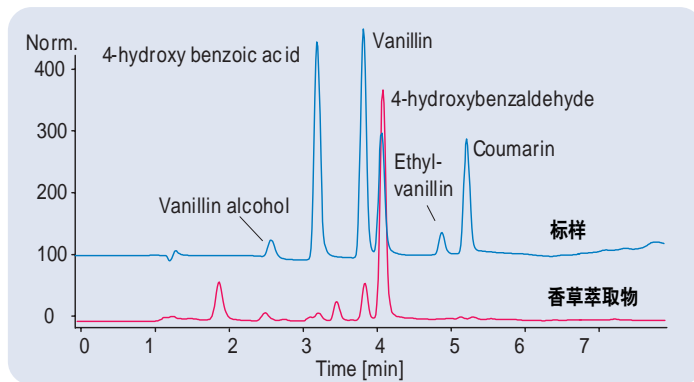


图8
香草萃取物的质量测定

分析条件如上, 除了下列条件
 色谱柱: 100 x 2.1 mm,
 Hypersil ODS, 5 μ m
 流动相: A = 水 + 5 mM
 NaH_2PO_4
 B = methanol
 梯度洗脱: 在 10 分钟 70 % B
 流速: 0.4 ml/min

高效液相色谱的分析方法评价

检测限: 0.2-5 ng(进样量),
 S/N = 2

重复性:
 10 次进样, 保留时间 < 0.2 %。
 的相对偏差
 10 次进样, 峰面积的 < 1 %
 相对偏差

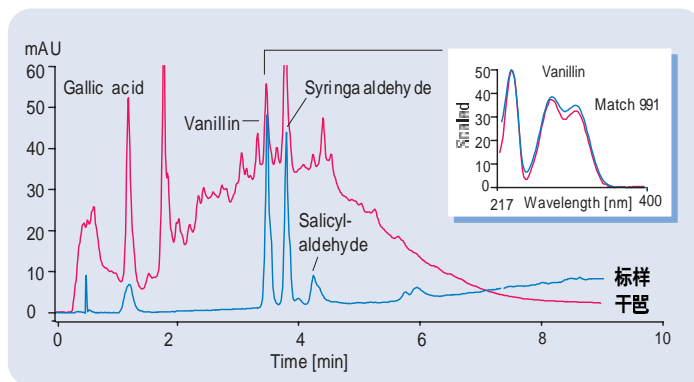


图9
法国干邑(cognac)中的香草素分析
利用紫外光谱图进行确认



7. Herrmann, A, et al., "Rapid control of vanilla-containing products using HPLC"; *J. Chromatogr.*, **1982**, 246, 313-16.



苦味化合物分析： 橘皮苷和 4,5,7 三羟基黄酮

对于橙汁中的苦味化合物的样品制备

样品制备方法根据 Carrez 1 和 2 的程序进行。这种方法使用 ferrocyanide 钾和硫酸锌来使蛋白质沉淀。

色谱条件

对上述两种香料可用反相液相色谱进行分析。可以用紫外光谱图进行化合物的定性分析确定。

样品制备:	橙汁样品的制备方法依据 Carrez 方法 1 和 2
色谱柱:	125 x 4 mm, Hypersil BDS, 5 μ m
流动相:	A = 水 + 0.15 ml/l 硫酸(浓), pH = 2.4 B = 乙腈
梯度洗脱:	起始 20 % B 在 3 分钟 40 % B 在 5 分钟 90 % B 在 6 分钟 20 % B
流速:	2 ml/min
后运行时间:	1 分钟
柱温:	40°C
进样体积:	1 μ l
检测器:	UV-DAD 检测波长 260/80 nm 参比波长 380/80 nm

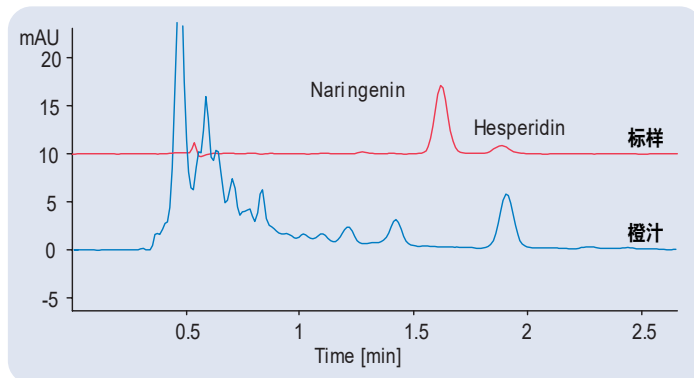


图 10
橙汁中的苦味化合物分析

高效液相色谱分析方法评价

检测限	1 ng (进样量)
DAD,	S/N = 2
重复性:	
10 次进样的保留时间	< 0.2 %
相对偏差	
10 次进样的峰面积	< 1 %
相对偏差	



8. *Official Methods of Analysis*; Horwitz, W., Ed.; 14th ed.; AOAC: Arlington, VA, 1984; secs 12.018-12.021.



第2章

食品添加剂





化学治疗药物 及抗寄生虫药物 残留的检测

除了几种其它的药物之外，硝基呋喃和磺胺药物如磺胺嘧啶，乙酰基代谢物，ethopabat，氯霉素，二氯二甲基吡啶酚，灭滴灵，异丙吡唑，痢特灵和镍碳常添加于家畜中的饲料中。

现代的家禽动物喂养过程中，必须防止由于病毒、细菌，原生动物或真菌导致的各种疾病。为了防止和控制这些疾病，采用了一系列的化学治疗药物。但是在给家禽动物喂了药物之后，在动物性食品中，如牛奶，蛋类和肉类中，经常出现药物残留的问题。这些化学治疗药物会导致细菌的抗药性。由于某些化学治疗药物对人有害，例如氯霉素，因此许多国家的政府部门，包括美国，德国，日本等国家都严格规定这些药物的残留限量。

为了检测食品中的化学治疗药物和抗寄生虫药物的残留量，必须开发简单而可靠的分析方法。有人开发了利用高效液相色谱法分析上述 11 种药物^{9,10}。其中内标化合物是 benzothiazuron 和保泰松钙。

样品制备

样品经过均质或搅碎之后，调节pH值，然后用液-液萃取法提取药残化合物，然后去脂肪类，净化和浓缩。



样品制备: 根据文献 9 进行
 样品制备
 色谱柱: 250 x 4.6 mm,
 Spherisorb ODS-2, 5 μm
 流动相: A = 0.02 M 醋酸铵,
 pH = 4.8 B = 乙腈/
 水 (60:40)
 梯度: start with 8 % B
 at 5 min 8 % B
 at 7 min 20 % B
 at 14 min 23 % B
 at 16 min 33 % B
 at 19 min 40 % B
 at 21 min 50 % B
 at 26 min 60 % B
 at 30 min 80 % B
 at 33 min 90 % B
 at 43 min 90 % B
 at 55 min 8 % B
 流速: 1.5 ml/min
 进样体积: 20 μl
 检测器: UV-DAD
 检测波长
 275/80 nm, 315/80 nm,
 360/80 nm,
 参比波长
 500/100 nm

高效液相色谱评价

检测限 0.001 - 0.05 mg/kg
 重复性:
 10 次进样, 保留时间重 < 0.12 %
 复性, 相对偏差(RSD)
 10 次进样, 峰面积重复 < 1.5 %
 性, 相对偏差(RSD)

色谱条件

利用反相液相色谱-紫外可见光二极管阵列检测器技术检测蛋类, 牛奶和肉类食品中的药残。利用紫外光谱图来提供辅助的定性信息。

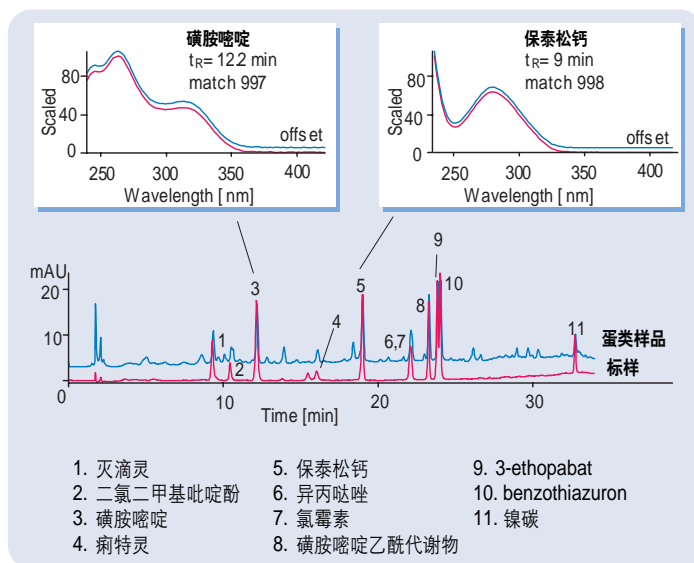


图 11
 蛋类食品中的药残分析。利用紫外光谱图
 进行定性分析



9. H. Malisch, et al., "Determination of residues of chemotherapeutic and antiparasitic drugs in food stuffs of anomaly origin with HPLC and UV-Vis diode-array detection", *J. Liq. Chromatogr.*, **1988**, 11 (13), 2801-2827.14.
 10. EC Guideline 86/428 EWG **1985**.



四环素分析

四环素分析以口服的形式或被添加于动物饲料中。在食用性动物中，四环素是广谱的抗生素类。

样品制备

样品经过均质或搅碎处理之后，加入酸将四环素与蛋白质分离出来，样品经液/液萃取，然后去脂/或去蛋白质，净化，最后浓缩¹²。

样品制备:	1g 样品与 100 mg 柠檬酸混合 → 加入 1 ml 30 % 的硝酸或 0.1 ml 的 oxalic 酸 → 加入 4 ml 甲醇，在超声波中振荡 5 分钟 → 加入水至总体积 10 ml → 离心 → 上清液进样
色谱柱:	100 x 4 mm, Hypersil BDS, 3 μm
流动相:	A = 水, pH = 2.1 (用硫酸调节) B = 乙腈
梯度:	起始 15 % B 在 10 分钟 60 % B
流速:	0.5 ml/min
柱温:	25°C
检测器:	UV-DAD 检测波长 355/20 nm 参比波长 600/100 nm

色谱条件

对肉类食品中的四环素检测一般采用液相色谱/紫外-可见光二极管阵列检测器的分析方法。除了保留时间之外，紫外光谱图可以作为定性的辅助手段。

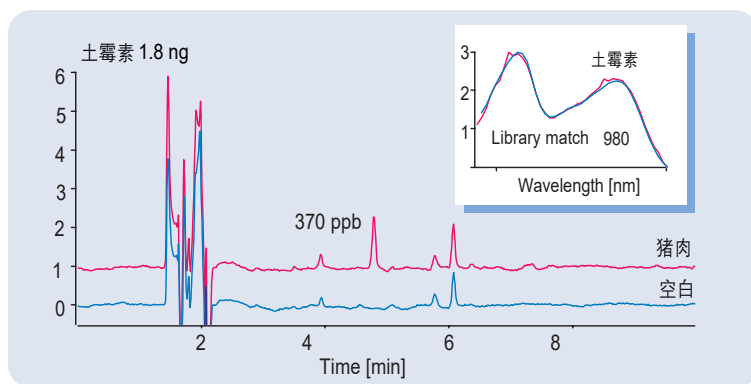


图 12 肉类食品中四环素残留物的分析。小图为土霉素的紫外光谱图与标准谱图的比较

高效液相色谱方法评价

检测限:	
对于 UV-DAD	100 ppb
重复性:	
10 次进样, 保留时间的相对偏差	< 0.2 %
10 次进样, 峰面积的相对偏差	< 2 %



9. H. Malisch et al., "Determination of residues of chemotherapeutic and antiparasitic drugs in food stuffs of anomaly origin with HPLC and UV-Vis diode-array detection" J. Liq. Chromatogr., **1988**, 11 (13), 2801-2827.14.
11. M.H. Thomas, J. Assoc. Off. Anal.; **1989**, 72 (4) 564.
12. Farrington et. al., "Food Additives and Contaminants, **1991**, Vol. 8, No. 1, 55-64".

烟曲霉素分析

烟曲霉素的特征结构是氨基多羟基的 19 碳链，与丙烷 1、2、3 - 羧酸的二酯结构。同系物 B1, B2, B3 如图 13 所示，其差别是羟基基因的数量和位置不同。

利用内源碰撞诱导解离技术，进行特征碎片分析表明，B2 和 B3 的质谱图一样。因此必须利用液相色谱 - 质联用的方法进行定量分析。在玉米粗提物中的烟曲霉素分析中，质谱加上内源碰撞诱导解离技术可以提供结构定性信息。为了同时获得特征碎片离子质谱图和分子离子峰，在方法设定中、扫描范围 150-680 amu 范围采用 100 V 的碰撞电压。

样品制备

参考文献¹³。

色谱条件

安捷伦 1100 液相 - 质谱仪是一种可靠而准确的分析手段。它的定性定量的检测水平可达 250 pg，而与化学结构无关同时不需要衍生化。安捷伦 1100 液相 - 质谱联用仪在选用选择离子扫描模式时，可以获得最优化的灵敏度。即使在采用全扫描模式下(150 amu 至 800 amu)，其灵敏度比荧光检测器高 10 倍。



液相-质谱条件

色谱柱: Zorbax Eclipse:
 XDB-C18,
 2.1 mm x 150 mm,
 5 μm
 流动相: A = 5 mm 醋酸铵 pH = 3
 B = 乙腈
 梯度: 起始 33 % B,
 8分钟 60 % B
 9分钟 33 % B
 流速: 0.25 ml/min
 进样体积: 5 μl
 柱温: 40°C
 离子化模式: 电喷雾: 正离子化模式或
 大气压化学电离源, 负离子
 化模式
 雾化器压力: 30 psig
 干燥气温度: 350°C
 干燥气流速: 6 l/min
 毛细管电压: 4000 伏
 碰撞电压: 100 伏
 扫描范围: 120-820 amu

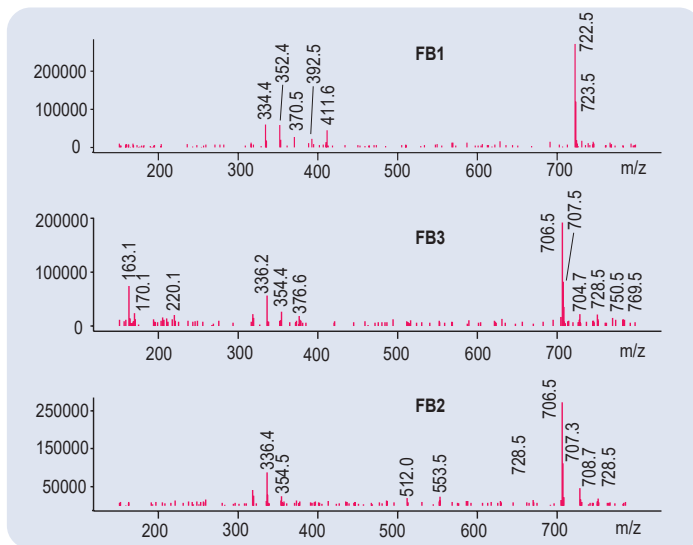


图 13 当碰撞电压从 230V 到 100V 时, 烟曲霉素 B1, B2 和 B3 的质谱图

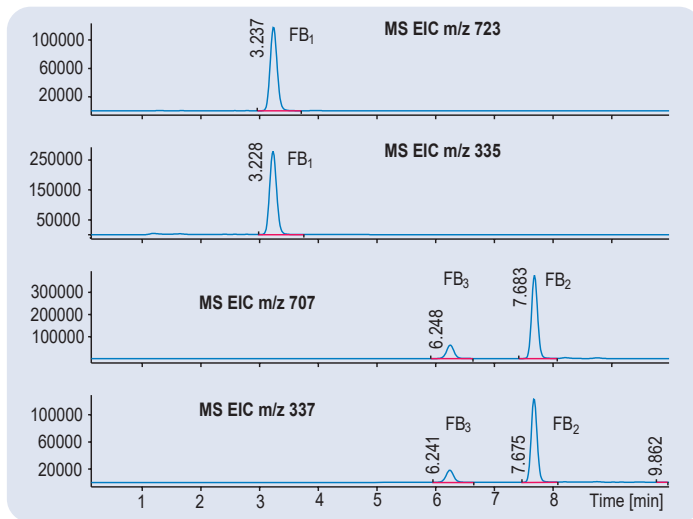


图 14 玉米中烟曲霉素的检定, 利用保留时间和质谱图同时确认



13. Lebensmittel- und Bedarfsgegenständegesetz, Paragraph 35, Germany.

霉菌毒素的分析

黄曲霉素 G₂, G₁, B₂, B₁, M₂ 和 M₁; 赭曲霉素 A; 玉米赤霉烯酮和棒曲霉素都是要求检测的化合物。

霉菌毒素的毒性很高，它是由于真菌产生的。当食品的储藏条件适合于真菌生长时，这些毒素就会生成，从而导致食品污染。这些毒素的分子量相对较高，而且含有一个或几个氧化脂环。由于已发现的此类霉菌毒素类型超过 100 种，因此要想分析每一个毒素及代谢物是非常困难的。大多数的霉菌毒素是采用薄层色谱进行分析的。但是高效液相色谱以其更高的分离能力和更短的分析时间的优点，使得液相色谱方法越来越受到广泛地应用。在采用合适的样品浓缩方法和灵敏的检测技术时，检测限可达 ppb 水平。

样品制备

样品的制备根据官方公布的方法¹³进行。对于不同类型的霉菌毒素的分析，须采用不同的样品制备及液相分析条件。后面表格中总结了食品中各种霉菌毒素分析条件。

色谱条件

本文介绍了反相液相色谱 / 紫外 - 可见光二极管阵列检测器和荧光检测器用于花生，调味品，动物饲料，牛奶制品，谷物，面粉，无花果和苹果等食品中的霉菌毒素的检测。



样品类型	基体	样品制备	色谱条件
黄曲霉素 G ₂ , G ₁ , B ₂ , B ₁ , M ₂ , M ₁	干果, 调味品 动物饲料 牛奶, 乳制品	⇒ 萃取方法 参见文献 ^{8,12}	Hypersil ODS, 100 x 2.1 mm, 3- μ m 水 / 甲醇 / 乙腈(63:26:11)** 流速: 0.3 ml/min (25°C) 二极管阵列(DAD): 365/20 nm 荧光检测器(FLD): 激发波长 365 nm 发射波长 445 nm
赭曲霉毒素 A	谷类, 面粉, 无花果	⇒ 样品制备方法 参见文献 ^{8,12} ⇒ 用盐酸酸化 ⇒ 用甲苯萃取 ⇒ SiO ₂ 净化, 用甲苯 / 乙酸 (9:1)洗脱	Lichrospher 100 RP18, 125 x 4 mm, 5- μ m 2% 醋酸水溶液 / 乙腈(1:1)* 流速: 1 ml/min, 40°C 荧光检测器: 激发波长 347 nm 发射波长 480 nm
玉米赤霉烯酮	谷类	⇒ 用甲苯萃取 ⇒ C18 小柱净化 ⇒ 甲苯 / 醋酸(95:5) 洗脱 ⇒ AOAC 985.18:4 ° - 玉米赤霉烯 酮和玉米赤霉烯酮	Hypersil ODS, 100 x 2.1 mm, 3 μ m 水 / 甲醇 / 乙腈(5:4:1), 等梯度洗脱 * 流速: 0.45 ml/min (45°C) 二极管阵列检测器: 236/20 nm 荧光检测器: 激发波长 236 nm 发射波长 464 nm
棒曲霉素	苹果及相 关产品	⇒ 用 Extrelut 小柱净化 ⇒ 硅胶柱净化 ⇒ 用甲苯 / 乙酸 乙酯(3:1)洗脱	Superspher RP18, 125 x 4 mm, 4- μ m; 水: 乙腈(5:95) 流速: 0.6 ml/min (40°C) 二极管阵列检测器: 270/20 nm 或: Lichrospher diol 125 x 4 mm, 5 μ m 正乙烷 / 异丙醇(95:5), 等梯度洗脱 流速: 0.6 ml/min (30°C) 二极管阵列检测器: 270/20 nm

* Lebensmittel- und
Bedarfsgegenstandesgesetz, Germany

** 100 % B is recommended for cleaning
the column

高效液相色谱方法评价

检测限	1-5 µg/kg
重复性:	
10次进样的保留时间的相对偏差	< 0.12 %
10次进样的峰面积的相对偏差	< 1.5 %
线性范围: UV-DAD	1-500 ng
FLD:	30 pg - 2 ng

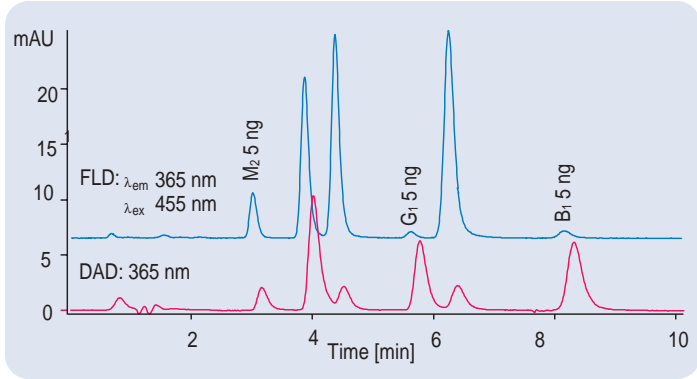


图 15
利用紫外和荧光检测器分析黄曲霉素

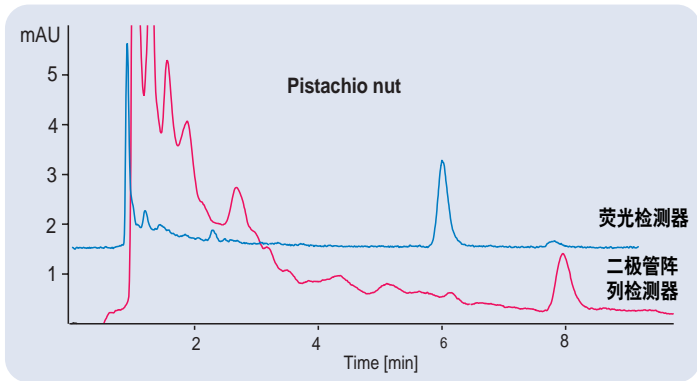
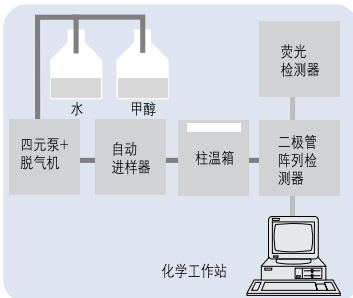


图 16
用紫外和荧光检测器分析开心果中的黄曲霉素



13. Lebensmittel- und Bedarfsgegenständegesetz, Paragraph 35, Germany.
4. *Official Methods of Analysis, Food Compositions; Additives, Natural Contaminants*, 15th ed; AOAC: Arlington, VA, **1990**, Vol. 2.; AOAC Official Method 980.20: aflatoxins in cotton seed products; AOAC Official Method 986.16: Aflatoxins M1, M2 in fluid milk; AOAC Official Method 985.18: a-zearalenol.

双酚 A 二环氧丙醚分析

双酚A二环氧丙醚常存在于三种最常用的涂层材料中(环氧涂漆, 有机溶胶涂漆, 和聚酯涂漆), 主要是用于罐头食品罐的内层表面的保护层材料。在罐头食品中常常含有高脂肪的食品, 双酚 A 二环氧丙醚会扩散而进入脂肪中, 但是在水中会发生水解。

在体外测试中, 发现双酚 A 二环氧丙醚怀疑是诱导有机体突变的物质, 但是后来用体内测试时, 结果有所不同。进一步的试验正在进行中, 目前对此化合物的最高限量为 1 mg/kg 食品。

样品制备

用 50/50 的水/乙醇溶液提取或(正庚烷)在回流温度下回流 6 小时。

色谱条件

本文应用安捷伦 1100 液相/质谱仪进行双酚 A 二环氧丙醚的快速分离检测。通过调节碰撞诱导解离电压可以获得分子量和特征碎片离子的信息。

LC/MS 条件

色谱柱 Zorbax Eclipse
XDB-C8,
2.1 mm x 50 mm,
5 μ m
流动相: A = 5 mM 醋酸铵水溶,
pH = 3
B = 乙腈
梯度洗脱: 0 分钟 25 % B
5 分钟 50 % B
流速: 300 μ l/min
进样体积: 1 μ l
柱温: 40 $^{\circ}$ C
检测器 UV-DAD
检测波长 210/6 nm
参比波长 360/60 nm
检测波长 254/6 nm
参比波长 360/60 nm

离子源: 电喷雾, 正离子模式
雾化器压力: 50 psig
干燥气温度: 350 $^{\circ}$ C
毛细管电压: 3500 V
碰撞电压(Fragmentor): 70 V
扫描范围(m/z): 250-400
扫描速度: 2 s/scan

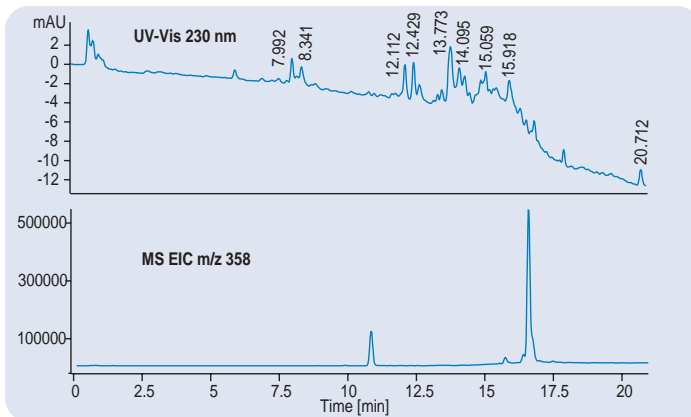


图 17 吞拿鱼萃取物中 0.2 ppm 双酚 A 二环氧丙醚的分析, 进样体积 1 μ l

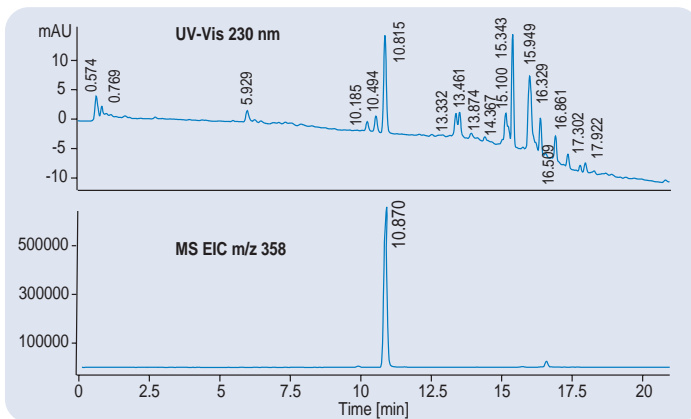


图 18 沙丁鱼萃取物中 20 ppm 双酚 A 二环氧丙醚的分析, 进样体积 1 μ l

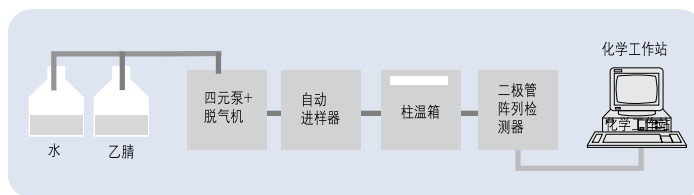


农药分析

下述所列为要求检测的农药化合物：三嗪，苯脲－除草剂，Methabenzthiazuron，杀草快，百草枯，和 mercaptobenzo-thiazol。氨基甲酸盐和草甘磷用此方法进行分析，但是使用不同的仪器配置。在许多国家，食品中的农药残留状况越来越受到关注。因此出台了许多法规来规定食品中各种农残的限量。对于不挥发和热不稳定的农残化合物，高液相相色谱是合适的检测方法。

样品制备

样品的制备和富集完全取决于样品的基质。对于饮用水，使用固相萃取法，而对于蔬菜样品，均质之后用液/液萃取法提取化合物，然后再进行样品的净化和富集。



14. Specht, W. rganochlor- und Organophosphor-Verbindungen sowie stickstoffhaltige sowie andere Pflanzenschutzmittel 旨 DFG-Methodensammlung, 1982, 19.

液相色谱条件

本文中介绍了高效色谱法用于色拉和调味品中农残分析。

样品制备:	色拉均质之后, 用液/液萃取。萃取液经凝胶过滤色谱进行净化, 用环己烷/乙酸乙酯洗脱。调味品的处理参见文献 14。
色谱柱:	100 mm x 3 mm, Hypersil BDS, 3 μm
流动相:	水/乙腈(95:5)
梯度洗脱:	在 10 分钟 25 % 乙腈 在 26 分钟 42 % 乙腈 在 34 分钟 60 % 乙腈
平衡时间:	在 10 分钟, 用 100 % 乙腈洗脱
后运行时间:	6 分钟
流速:	0.5 ml/min
柱温:	42 °C
进样体积:	3-10 μl
检测器	UV-DAD 检测波长 214/15 nm, 230/20 nm 和 245/20 nm 参比波长 400/80 nm

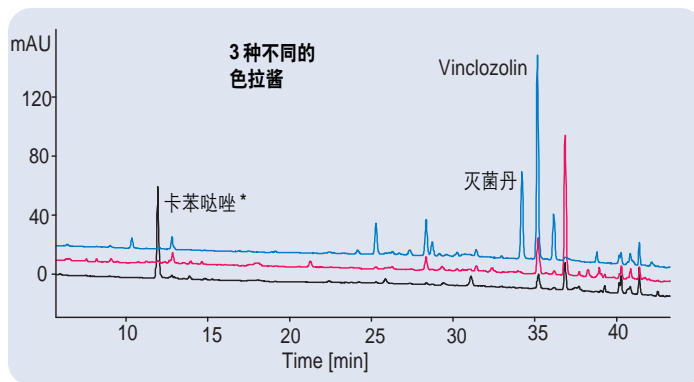


图 19
三种不同色拉酱中的农药残留分析
* 卡苯哒唑的回收率较低, 只有 40%

高效液相色谱评价

检测限	0.01 μg/l
重复性:	
10 次进样, 保留时间重	< 0.2 %
复性, 相对偏差(RSD)	
10 次进样, 峰面积重复	< 1 %
性, 相对偏差(RSD)	

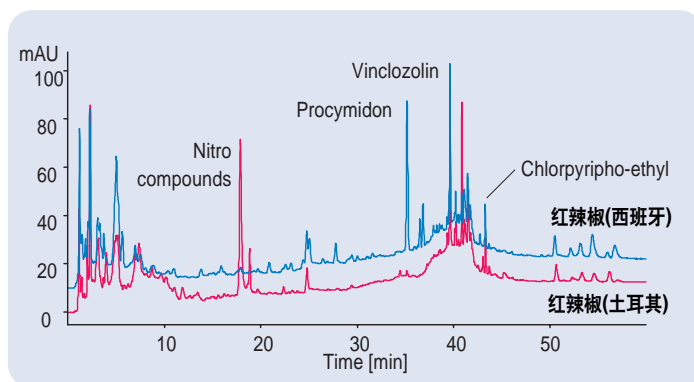


图 20
两种红辣椒中的农药残留分析



氨基甲酸盐

氨基甲酸盐农残

一般的分析方法是用高效液相色谱-柱后衍生化荧光检测器进行此类化合物的检测¹⁵。在进行高效色谱法分析时,在中性pH值下,用水萃取水果和蔬菜中的氨基甲酸盐农药残留。

样品制备: 无
 色谱柱: 250 x 4 mm C18 柱, 柱后衍生化(pickering), 5 μm
 流动相: 水 / 甲醇 (甲醇, 88:12)
 梯度洗脱: 在 2 分钟 12 % 甲醇
 在 42 分钟 66 % 甲醇
 在 46 分钟 66 % 甲醇
 在 46.1 分钟 100 % 甲醇
 在 49 分钟 100 % 甲醇
 流速: 0.8 ml/min
 柱温: 37°C
 进样体积: 10 μl 标准品
 荧光检测:

激发波长 230 nm 或 330 nm
 发射波长 425 nm
 放大器增益: 12
 响应时间: 4 秒

衍生化试剂泵:
 用于水解化的反应试剂流速
 0.3 ml/min (NaOH)
 用于衍生化的试剂的流速:
 0.3 ml/min (OPA)

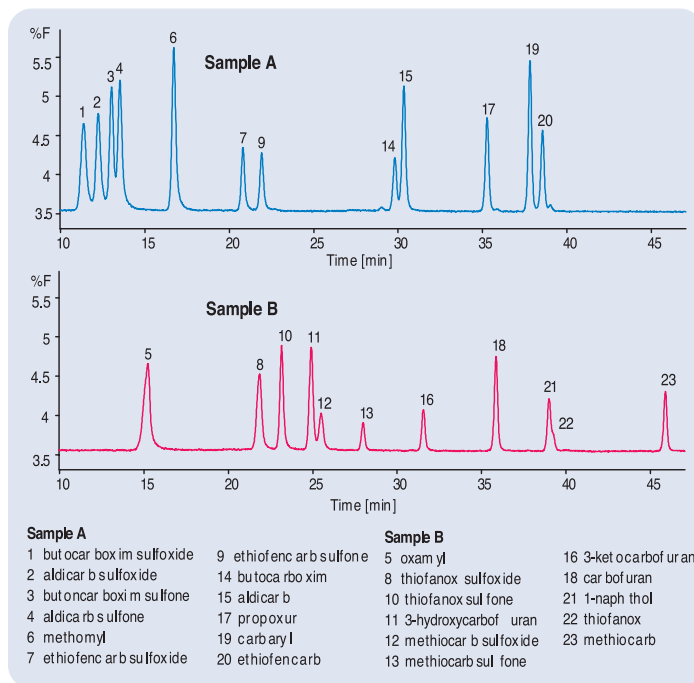
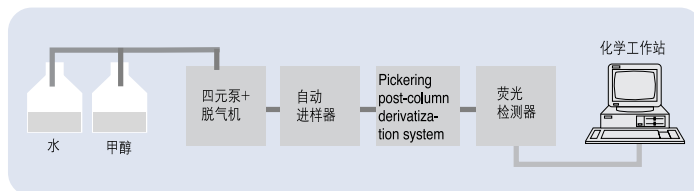


图 21

高效液相色谱方法评价

检测限: 100 ppf, SIN = 2
 重复性:
 10 次进样的保留时间 < 0.1 %
 的相对偏差
 10 次进样的峰面积的
 相对偏差 < 0.5~5 %



15. "A new approach to lower limits of detection and easy spectral analysis" *Agilent Primer 5968-9346E, 2000*

草甘磷 草甘磷分析

色谱条件：本文介绍了使用高效液相色谱 / 柱后衍生化技术分析水中的草甘磷。

样品制备:	无
色谱柱:	150 x 4 mm 阳离子 交换柱, 钾(k ⁺)来自 pickering, 8 μm
流动相:	A = 5 mM 磷酸二氢钾, pH=2.0 B = 5 mM 氢氧化钾
流速:	0.4 ml/min
梯度:	在 15 分钟 0 % B 在 17 分钟 100 % B
柱温:	55 °C
进样体积:	50 μl 标样
荧光检测器:	
激发波长:	230 nm 或 330 nm
发射波长:	425 nm
光电倍增管增益:	12
响应时间:	4 秒
衍生化试剂泵:	
用于水解的反应试剂	
流速 = 0.3 ml/min (OH)	
用于衍生化的反应试剂	
流速 = 0.3 ml/min (OPA)	

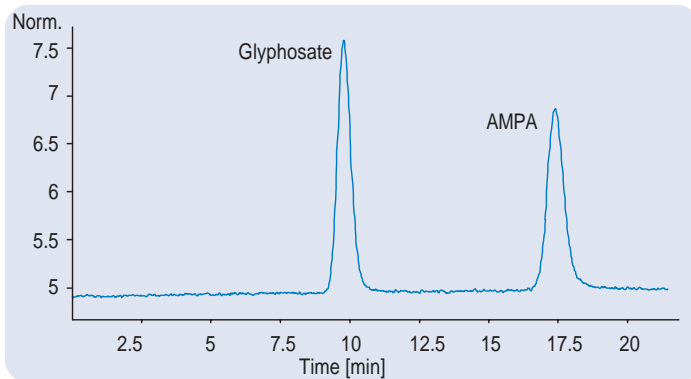
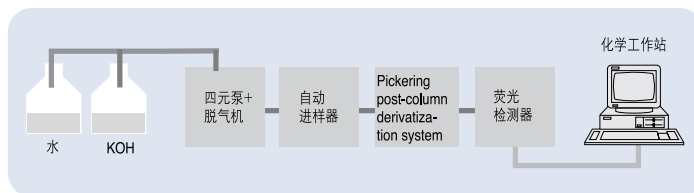


图 22
草甘磷标样的分析

高效液相色谱评价

检测限 500 ppt
重复性:
10 次进样, 保留时间重 < 0.8 %
复性, 相对偏差(RSD)
10 次进样, 峰面积重复 < 2.2 %
性, 相对偏差(RSD)



16. R. Schuster, "A comparison of pre- and post-column sample treatment for the analysis of glyphosate", *Agilent Application Note 5091-3621E*, 1992.



第 3 章

食品中天然化合物的分析



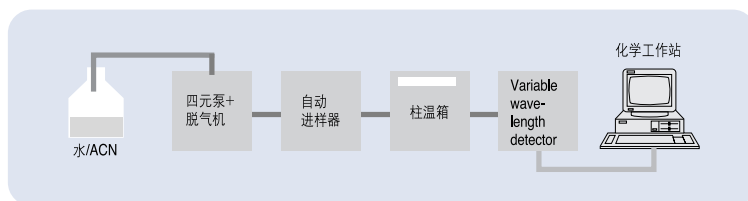


无机阴离子分析

氯离子，硝酸根离子和硫酸根离子常被用于食品工业中的添加剂。例如亚硝酸盐是作为烟熏香肠类食品的防腐剂。当今，采用特殊的色谱柱结合电导检测器可以分析无机离子。由于这些特殊的仪器的应用范围很窄，因此开发使用常规的反相色谱 / 紫外检测的方法来检测无机阴离子。另外，在检测器方面，可选择灵敏度更高的电化学检测器。

样品制备

若样品是水溶液状态的，只需过滤即可进行分析。其它类型的基质样品，可以使用热水萃取，然后过滤即可。



色谱条件

高效液相色谱可以用于饮用水中的无机阴离子。

样品制备:	过滤
色谱柱:	HP-IC(包括流动相改性剂)
流动相:	水 / 乙腈(86:14), pH=8.6 (用于磷酸盐的氢氧化钠)
流速:	1.5 ml/min
柱温:	40 °C
进样体积:	25 µl
检测器:	UV-DAD 检测波长 266 nm

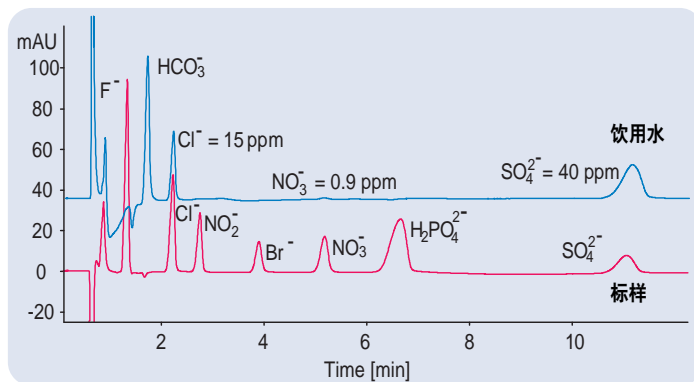


图 23
间接紫外检测法分析饮用水中的阴离子

高效液相色谱方法评价

检测限: (UV-DAD)	0.1-1 ppb (S/N=2), 25 µl
重复性: 进样 10 次的保留时间 的相对标准偏差	< 0.8 %
进样 10 次的峰面积 的相对标准偏差	< 1 %



用于电化学检测的色谱条件

本文介绍了利用液相 / 电化学检测法分析食用盐中的碘离子¹⁷。

样品制备:	食品盐溶于水中
色谱柱:	200 x 4 mm, Sperisorb ODS2, 5 μm
流动相:	5.2 g K_2HPO_4 /L + 3 g 磷酸二氢叔丁基铵/L 的 水溶液 / 乙腈(85:15)
流速:	1 ml/min
柱温:	室温 24°C
进样体积:	0.1 μl
检测器:	电化学检测器(ECD)
电极:	玻璃碳电极
工作电位势:	1V
操作模式:	安培计

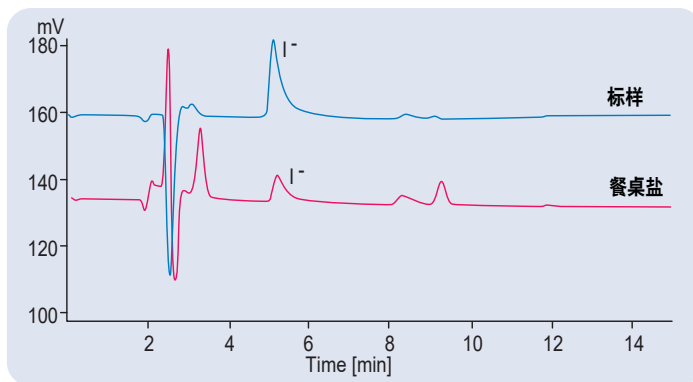
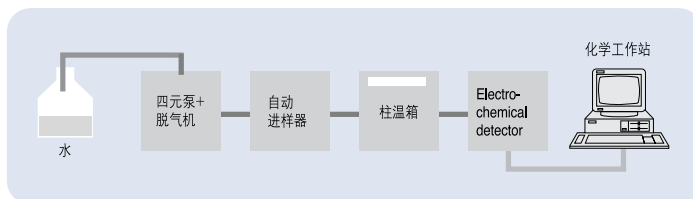


图 24
食用盐的分析

高效液相色谱方法评价

检测限: (对电化学检测器)	40 μg/L
重复性:	
10 次进样的保留时间 的相对偏差	< 0.1 %
10 次进样的峰面积 的相对偏差	< 3 %
线性范围:	50 pg 到 150 ng



17. A.G. Huesgen, R. Schuster, " Analysis of selected anions with HPLC and electrochemical detection", *Agilent Application Note* 5091-1815E, 1991.

油脂分析(Lipids)

通过甘油三酸酯的分析可以 鉴定脂肪和油是否有掺假 以及在处理过程中甘油 三酸酯是否有变性

经常需要分析食品中的饱和及不饱和甘油三酸酯。脂肪和油是由非常复杂的甘油三酸酯，固醇和维生素组成。甘油三酸酯的成份对于食品加工和营养调控是非常关键的。由于含有不饱和脂肪酸的甘油三酸酯的稳定性不好，因此在见光和氧气之后会形成过氧化氢化合物，从而大大影响脂肪和食品用的味道和质量。

利用高效液相色谱 / 紫外-可见光二极管阵列检测器分析甘油三酸酯，过氧化氢化合物，固醇和维生素。可根据紫外光谱数据来判断是否存在过氧化氢化合物以及区分饱和和不饱和甘油三酸酯。在橄榄油中的不饱和甘油三酸酯有其特征的指纹分布。其它的脂肪和食用油也是含有甘油三酸酯的混合物，但是其特征指纹分布完全不同。通过甘油三酸酯的分析可以鉴定橄榄油中是否有掺杂外来脂肪和使用精炼过的甘油三酸酯。

样品制备

样品首先经均质，然后用石油醚萃取。脂肪和食用油可溶于四氢呋喃¹⁷。



橄榄油中的甘油三酸酯分析

在橄榄油的不饱和和甘油三酸酯具有其非常特征的分布。其它的脂肪和食用油也是各种甘油三酸酯的混合物，但是分布不同。

样品制备

甘油三酸酯可以用石油醚从已均质的样品中萃取出来。脂肪和食用油可以溶解于四氢呋喃。

色谱条件

本文介绍的液相色谱条件中用于分析不饱和甘油三酸酯，LnLnLn, LLL 和 OOO¹⁸。

样品制备:	样品溶解于四氢呋喃中
色谱柱:	200 x 2.1 mm Hypersil MOS, 5 μm
流动相:	丙酮 / 乙腈(30:70)
流速:	0.5 ml/min
柱温:	30°C
进样体积:	2 μL
检测器:	示差折光检测器

高效液相色谱分析方法评价

检测限:	50 μg/l, S/N = 2
重复性:	
10次进样的保留时间 的相对偏差	< 0.3 %
10次进样的峰面积 的相对偏差	< 5 %

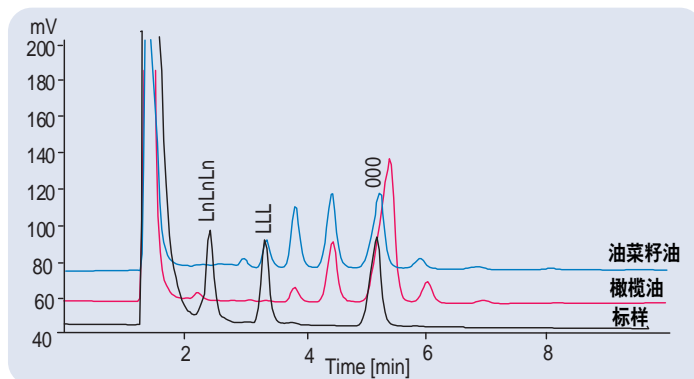
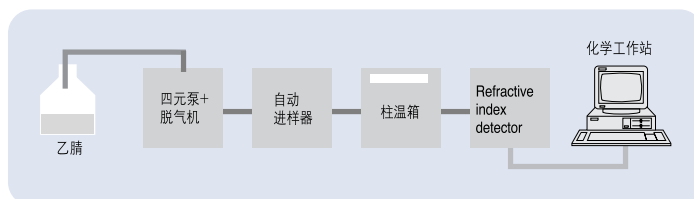


图 27
橄榄油和油菜籽油中的甘油三酸酯的分析



18. "Determination of triglycerides in vegetable oils",
EC Regulation No. L248, 28ff.



脂肪酸分析

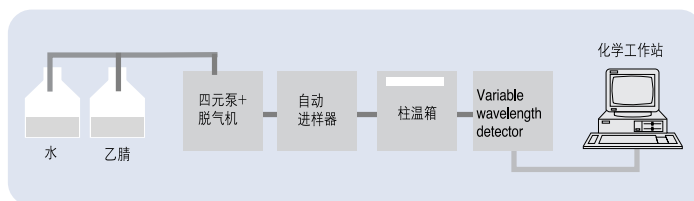
本文介绍了 C_4 到 C_{22} 的饱和和不饱和脂肪酸的分析。脂肪酸是食用油和脂肪中的初级组份，在每一种产品中以特定的形式存在。例如，黄油和人造黄油可以根据甘油三酸酯中的酯酸的百分含量来区别。为了确定脂肪或食用油中脂肪酸的分布，其中游离脂肪酸可以通过水解的方式获得。经过衍生化反应，然后用液相 / 紫外检测器分析。

样品制备

甘油三酸酯用热甲醇和氢氧化钾水解，然后衍生化。

色谱条件

本文介绍了液相色谱法确定食用脂肪中的脂肪酸的分布。整个方法包括用热氢氧化钾 / 甲醇水解，用溴代苯酰溴化物 (bromophenacyl bromide) 进行在线衍生化。



样品制备

0.215 g 脂肪用 500 微升甲醇/氢氧化钾在 80°C 水解 40 分钟。冷却之后, 1.5 ml 乙腈/四氢呋喃 (1:1), 混合物振荡 5 分钟。混合液用 0.45 μm Minisart RNML(从 Satorius 购买)过滤器。

色谱柱: 200 x 2.1 mm, MOS, 5 μm
流动相: A = 水(70%),
B = (乙腈+1% 四氢呋喃)

(30%)

梯度洗脱: 在 5 分钟 30 % B
在 15 分钟 70 % B
在 17 分钟 70 % B
在 25 分钟 98 % B

流速: 0.3 ml/min

柱温: 50°C

检测器: 可变波长检测器 258 nm

衍生化: 60 mg/ml bromophenacyl bromide 流于乙腈中

在线衍生化的自动进样器的程序

1. Draw 2.0 μl from vial 2 (ACN)
2. Draw 1.0 μl from air
3. Draw 1.0 μl from vial 3 (derivatization agent)
4. Draw 0.0 μl from vial 4 (wash bottle) (ACN/THF, 50:50)
5. Draw 1.0 μl from sample
6. Draw 0.0 μl from vial 4 (wash bottle)
7. Draw 1.0 μl from vial 3 (derivatization agent)
8. Draw 0.0 μl from vial 4 (wash bottle)
9. Draw 1.0 μl from vial 5 (acetonitrile + 5 % TEA)
10. Draw 0.0 μl from vial 4 (wash bottle)
11. Mix 9 μl in air, 30 μl/min speed, 10 times
12. Wait 2.0 min
13. Inject

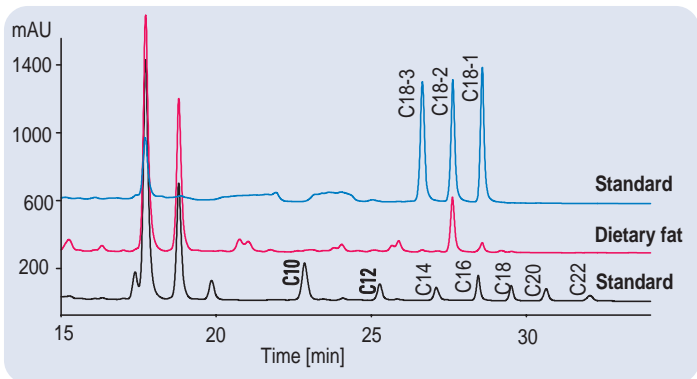


图 28
食用脂肪分布的分析。一个样品和两个标样的色谱图的叠加图

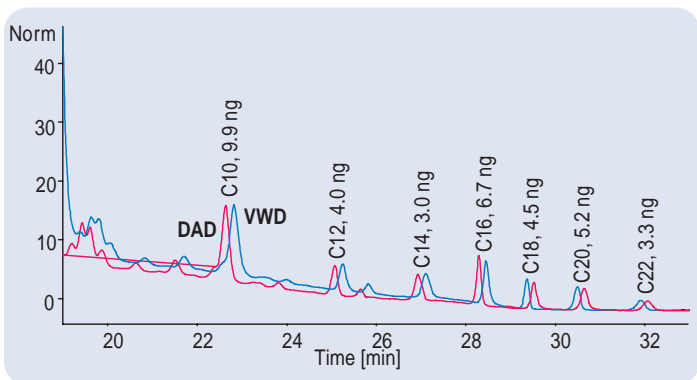


图 29
利用二极管阵列检测器和可变波长检测器分析微量的甘油三酸酯

高效液相色谱方法评价

检测限: 200 pg
S/N = 2

重复性:
10 次进样, 保留时间 < 0.1 %。

的相对偏差
10 次进样, 峰面积的 5 %
相对偏差

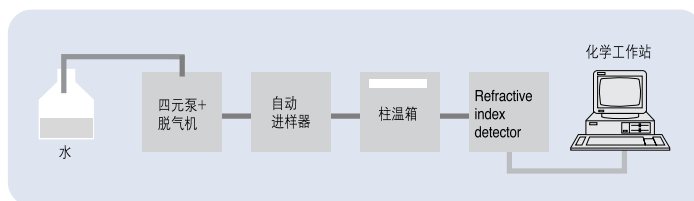


糖类化合物分析

本文介绍了如何分析以下系列的糖类化合物:葡萄糖,半乳糖,棉子糖,果糖,甘露醇,山梨醇,乳糖,麦芽糖,纤维二糖和蔗糖。食品中含有不同化学反应活性和分子量的糖类化合物。因为糖没有色谱发光基因或荧光发光基因,所以它们无法用紫外-可见光或荧光检测技术分析。目前,使用示差折光检测器来分析 ppm 水平的糖,而电化学检测器可使检测限达到 ppb 水平。

样品制备

样品经过脱气过滤之后,直接进样分析。而对于复杂的样品则需要样品净化,如脂肪萃取和蛋白质沉淀过程。而对于弱极性的杂质,可以用 C18 固相萃取小柱来去除。



色谱条件

高效液相色谱可以分析单、双及三聚糖，和糖醇。

样品制备:	样品直接进样
色谱柱:	300 x 7.8 mm Bio-Rad HPXP, 9 μm
流动相:	水
柱温:	80°C
流速:	0.7 ml/min
检测器:	示差折光检测器

高效液相色谱分析方法评价

检测限:	< 10 ng, (S/N = 2)
重复性:	
10次进样的保留时间 的相对偏差	< 0.05 %
10次进样的峰面积的 相对偏差	< 2 %

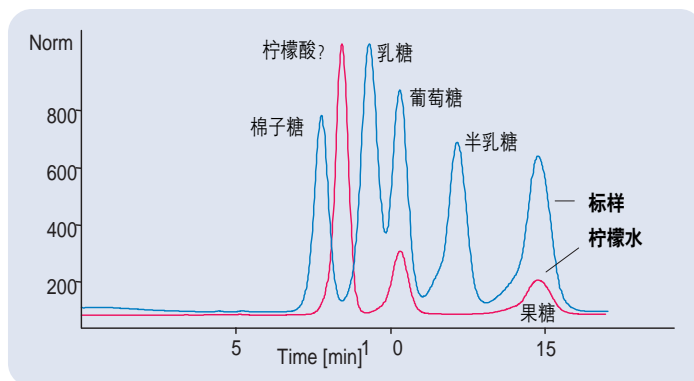


图 30
柠檬水中糖的分析

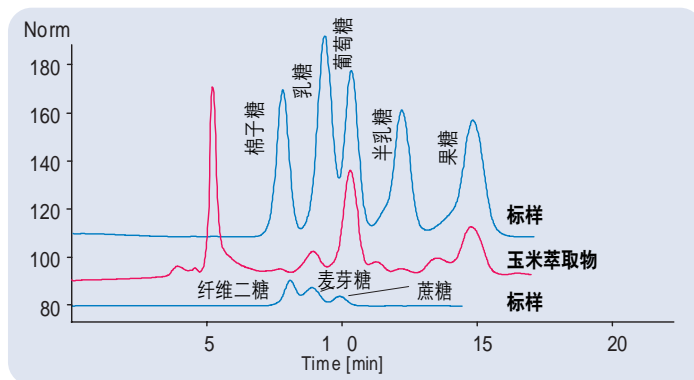


图 31
玉米萃取物中的糖类化合物分析



4. *Official Methods of Analysis, Food Compositions; Additives, Natural Contaminants*, 15th ed; AOAC: Arlington, VA, 1990, Vol. 2; AOAC Official Method 980.13: Fructose, glucose, lactose, maltose, sucrose in milk chocolate; AOAC Official Method 982.14: Glucose, fructose, sucrose, and maltose in presweetened cereals; AOAC Official Method 977.20: Separation of sugars in honey; AOAC Official Method 979.23: Saccharides (major) in corn syrup; AOAC Official Method 983.22: Saccharides (minor) in corn syrup; AOAC Official Method 984.14: Sugars in licorice extracts.



维生素分析

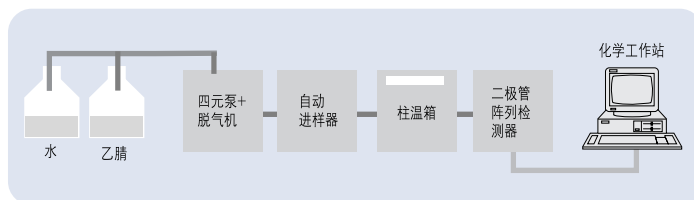
维生素分脂溶性的，如维生素E, D和A和水溶性的如维生素C, B₆, B₂, B₁和B₁₂。

维生素是生物活性物质，它们对人类的健康和生长是很重要的。食品中维生素的含量有时候可低至每100克样品中几个微克的水平。维生素还经常与具有相似化学性质的其它化合物共存。对于食品中维生素的检测，既要求定性又要求定量。维生素一般来说是热不稳定的，光和氧不稳定的化合物。高效液相色谱可以在室温和避光和氧的条件，分离及检测维生素化合物¹⁹。通过光谱的信息，可以对维生素进行定性及定量的分析。其它高灵敏度高选择性的检测器是电化学检测器。

水溶性维生素

样品制备

不同的食品基体，需要不同的样品净化过程。对于简单的基体，如维生素药片，经过均质之后，在超声波中用水直接萃取即可。



紫外检测的液相色谱条件

下面介绍使用液相方法检测维生素饮料中的各种维生素。

样品制备:	过滤
色谱柱:	100 x 4 mm, Hypersil BDS, 3 μ m
流动相:	A = 水, pH = 2.1 (用 H ₂ SO ₄ , 99%) B = 乙腈 (A/B = 99:1)
梯度洗脱:	在 3.5 分钟 1% B, 在 11 分钟 25% B, 在 19 分钟 90% B
后运行:	6 分钟
流速:	0.5 ml/min
柱温:	30°C
进样体积:	2-5 μ L
检测器	UV-DAD
	检测波长 220/30 nm
	参比波长 400/100 nm

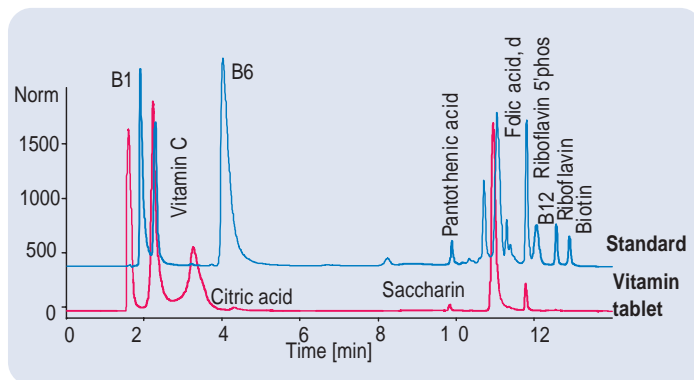


图 32
维生素片中的水溶性维生素分析

液相色谱方法评价

检测限:	< 500 pg (进样量), S/N = 2
重复性:	10 次进样的保留时间的 相对偏差 < 0.2 % 10 次进样的峰面积的 相对偏差 < 2 %

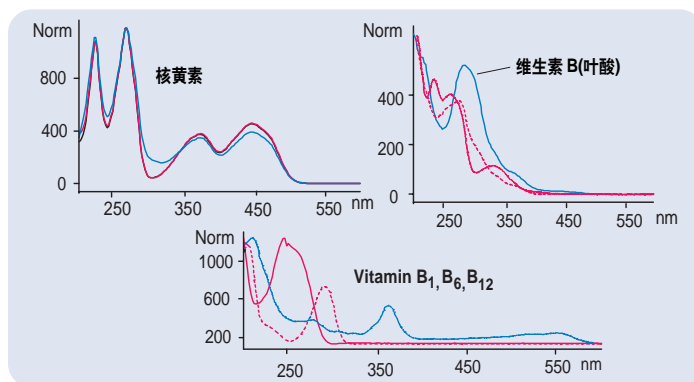


图 33
水溶性维生素的紫外光谱图

19. L.M. Nollet, "Food Analysis by HPLC", New York, 1992.



用电化学检测的色谱条件

下面介绍利用液相色谱方法分析动物饲料中的维生素。

样品制备:	维生素制备液用水稀释(1:100)
色谱柱:	125 x 4 mm, Lichrospher RP 18, 5 μ m
流动相:	水 + 0.02 M 磷酸二氢钾 + 0.03 M 硫酸氢叔丁基铵 + 0.03 M 庚烷磺酸 + 2 % 乙腈
停止时间:	15 分钟
流速:	0.8 ml/min
柱温:	30°C
进样体积:	1 μ l 标准; 0.5 μ l 样品
检测器:	电化学
工作电极:	玻璃碳电极
工作模式:	安培计
工作电位:	1.2 V
范围:	0.5 μ A
参比电极:	AgCl/KCl
响应时间:	1 秒

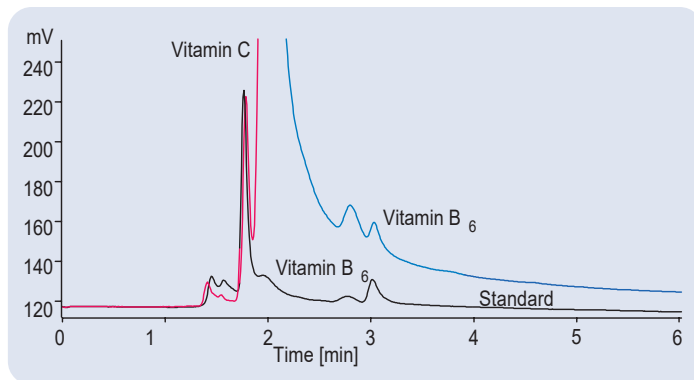
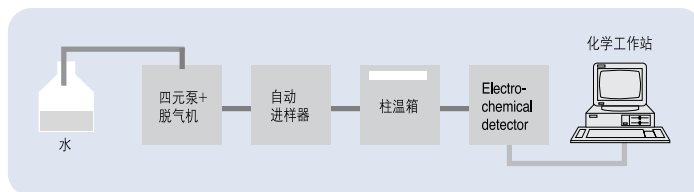


图 34
维生素的制备样品中的维生素 B₆ 的分析

高效液相色谱方法评价

检测限:	30 pg (进样量) S/N = 2
重复性:	
10 次进样的保留时间的相对偏差	< 0.5 %
10 次进样的峰面积的相对偏差	< 5 %
线性范围:	30 pg - 1 ng



20. A.G. Huesgen, R. Schuster, "Analysis of selected vitamins with HPLC and electrochemical detection", *Agilent Application Note 5091-3194E*, 1992.

脂溶性维生素的分析

样品制备

不同的食品基质需要不同的样品萃取过程。这些过程包括碱解酶解，醇能直接溶剂萃取和总脂含量的超临界萃取法。

色谱柱:	100 x 2.1 mm, Hypersil MOS, 5 μ m
流动相:	A = 水, B = 乙腈(70 %)
梯度洗脱:	在 15 分钟 90 % B, 在 16 分钟 95 % B
后运行时间:	3 分钟
流速:	0.5 ml/min
柱温:	40 $^{\circ}$ C
进样体积:	2-5 μ l
检测器	UV-DAD
	检测波长 230/30 nm, 400/100 nm
	参比波长 280/40 nm, 550/100 nm

高效液相色谱方法评价

检测限:	1 ppb (S/N = 2)
重复性:	
10 次进样的保留时间 的相对偏差	< 0.8 %
10 次进样的峰面积 的相对偏差	< 2.2 %

色谱条件—用紫外检测

下面介绍的是高效液相色谱方法用于维生素标样的分析

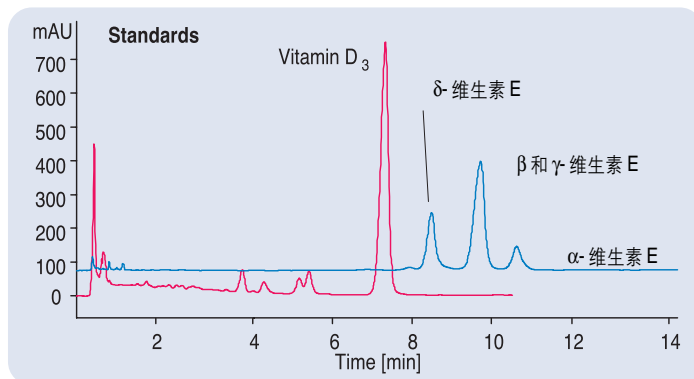
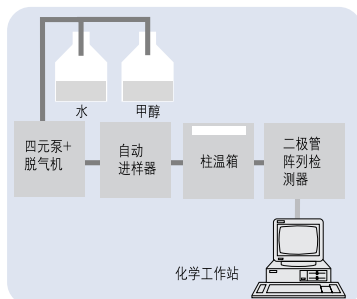


图 35
液相 / 紫外分析脂溶性维生素





液相 / 电化学检测器用于维生素的分析

下面介绍了电化学检测方法分析维生素标样。

色谱柱:	125 x 4 mm, Lichrospher RP 18, 5 μm
流动相:	甲醇 + 5 g/l 高氯酸锂 + 1 g/l 醋酸
停止时间:	20 分钟
流速:	1 ml/min
柱温:	30°C
进样体积:	1 μl 标样
检测器:	电化学检测器
工作电极:	玻璃碳电极
工作模式:	安培计
工作电位:	0.9 V
范围:	0.5 μA
参比电极:	AgCl/KCl
响应时间:	8 秒

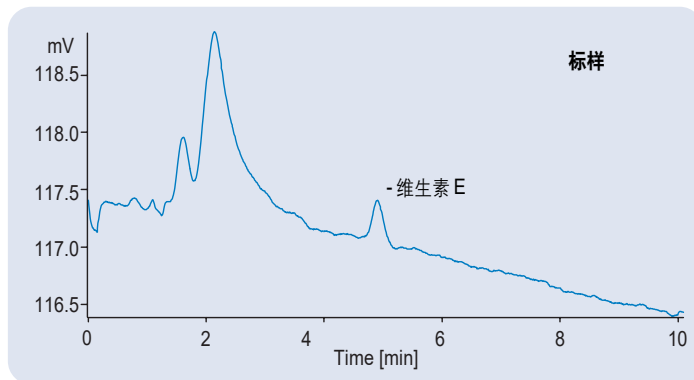
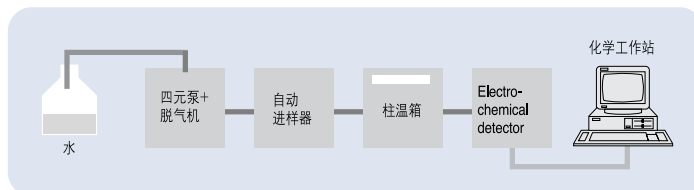


图 36
液相 / 电化学检测器分析脂溶性维生素

高效液相色谱方法评价

检测限:	80 pg (进样量) S/N = 2
重复性:	
10 次进样的保留时间 的相对偏差	< 0.5 %
10 次进样的峰面积 的相对偏差	< 5 %
线性范围:	30 pg - 1 ng



用正相色谱分析 维生素 E

在反相色谱上,无法分离所有的维生素E。但是正相色谱在等梯度条件下可以分离 8 个维生素 E(T)和生育三烯酚(T_3),这些化合物自然存在于脂肪,油和其它食品中。由于紫外的选择性不足以分辨其共流出化合物,因此采用荧光检测的方法。

正相色谱分析生育酚类化合物

下面介绍了液相色谱用于人造黄油中生育酚的分析。

样品制备:	20 g 样品溶于 1.5 ml 正己烷
色谱柱:	100 x 2.1 mm, Hypersil SI 100, 5 μ m
流动相:	正己烷 + 2 % 异丙醇
停止时间:	8 分钟
流速:	0.3 ml/min
柱温:	25 $^{\circ}$ C
进样体积:	0.5 μ l
检测器:	
UV-DAD	295/80 nm
荧光检测器:	激发波长 295 nm 发射波长 330 nm

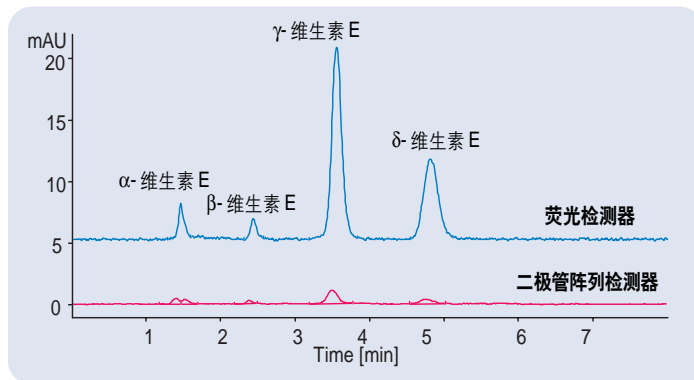


图 37
正相色谱 / 紫外或荧光分析各种生育酚

液相色谱方法评价

检测限: 紫外: 10-20 ng (S/N = 2)
荧光: 0.5-2 ng (S/N = 2)

对荧光检测的重复性:
10 次进样的峰的保留时间的相对偏差 < 2 %
10 次进样的峰面积的相对偏差 < 2 %

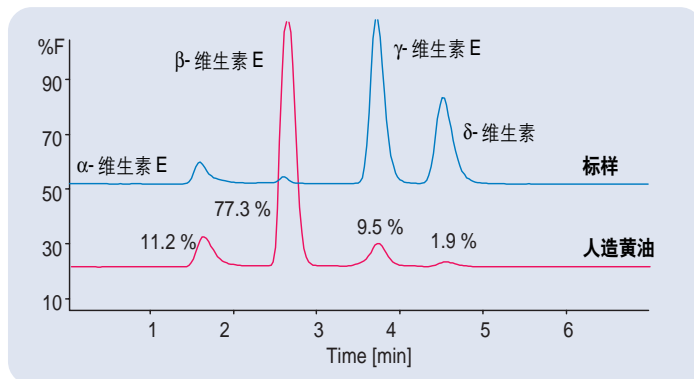
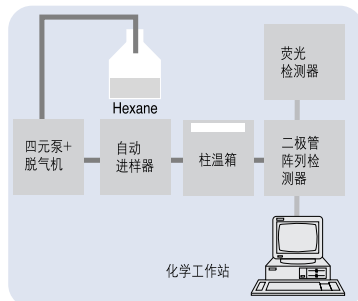


图 38
正相色谱 / 荧光分析人造黄油中的生育酚



生物胺分析

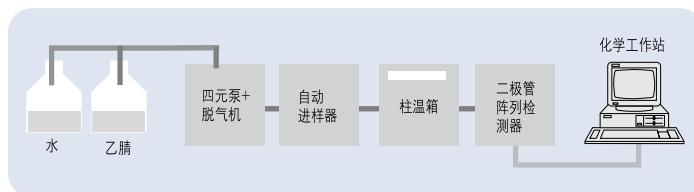
本文对下列的生物胺进行分析，氨水，戊胺，正丁胺，1,4-二氨基丁烷，1,5-二氨基戊烷，二乙胺，乙醇胺，乙胺，己胺，组胺，异丁胺，异丙胺，甲胺，3-甲基丁胺，吗啉，苯乙胺，丙胺，吡咯烷和色胺。

在各种食品中，饮料产品中，包括鱼，奶酪，葡萄酒和啤酒，常常存在游离胺。

某些胺在高浓度下具有毒性。因此一些国家对这些胺在食品中规定了最高限量。由于高效液相色谱具有样品制备简单，和分析时间短的优点，而成为食品中生物胺的首选方法。

样品制备

可以使用液/液萃取或固相萃取法来提取不同食品基质中的胺，然后衍生化反应。



紫外检测方法的色谱条件

下面介绍了液相 / 紫外法分析葡萄酒中的生物胺。

样品制备:

25 ml 葡萄酒用 polyvinylpyrrolidone 脱色。过滤之后, 生物胺(5 ml 样, pH = 10.5)用 2 毫升 10% 的丹酰氯(Dansylchloride)衍生化。反应产物用 C18 小柱(500 mg)的固相萃取法净化。用 2 ml 乙腈洗脱, 浓缩至 100 微升, 进样。

色谱柱: 250 x 4.6 mm, Spherisorb ODS2, 5 μ m
 流动相: A= 水 +5% 乙腈
 B= 乙腈; (A/B = 75/25)
 梯度洗脱: 在 5 分钟 45% B
 在 30 分钟 45% B
 在 50 分钟 60% B
 在 55 分钟 80% B
 在 60 分钟 80% B
 停止时间: 60 分钟
 后运行时间: 4 分钟
 流速: 1 ml/min
 柱温: 60°C
 检测器: 紫外—二极管阵列检测
 250 nm

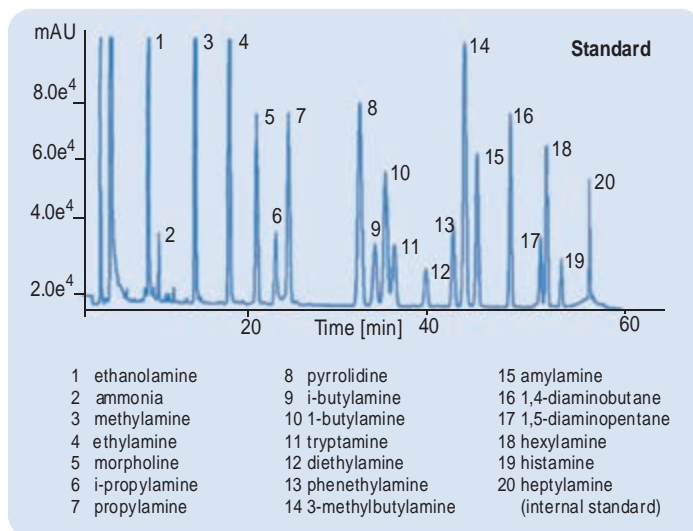


图 39
 衍生后, 用紫外检测分析生物胺标样

高效液相色谱方法评价

检测限: > 85 %
 50-150 μ g/l



21. O. Busto, et al., "Solid phase extraction applied to the determination of biogenic amines in wines by HPLC", *Chromatographia*, **1994**, 38(9/10), 571-578.



氨基酸分析

本文介绍的方法用一次采集，就可以同时分析一级和二级氨基酸。

蛋白质的氨基酸组成可以确定物质的来源，从而鉴别食品是否掺假。通过此分析，还可以判别某些有毒性的氨基酸。若使用手性柱，左旋和右旋的氨基酸也可以得到分离和定量。

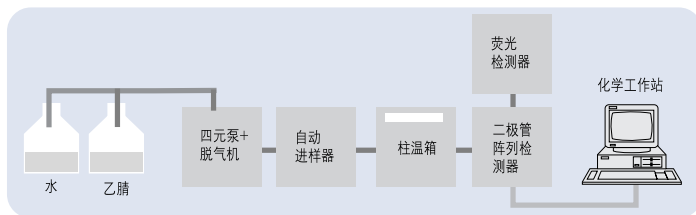
液相色谱配合自动在线衍生是一种非常好的氨基酸分析方法。此方法具有分析时间短和样品制备简单的优点。

样品制备

用盐酸(HCl)或酶解方法使蛋白质的键断裂。

色谱条件

液相 / 柱后衍生荧光检测法分析啤酒中的氨基酸^{22, 23}。



样品制备: filtration
 色谱柱: 200 x 2.1 mm
 Hypersil ODS, 5 μm
 流动相: A = 0.03 M sodium ac
 pH = 7.2 + 0.5% THF
 B = 0.1 M sodium acetate/
 ACN (1:4)

梯度洗脱:
 在 0 分钟 0 % B at 0.45 ml/min flow rate
 在 9 分钟 30 % B
 在 11 分钟 50 % B at 0.8 ml/min flow rate
 在 13 分钟 50 % B
 在 14 分钟 100 % B at 0.45 ml/min flow rate
 在 14.1 分钟 at 0.45 ml/min flow rate
 在 14.2 分钟 at 0.8 ml/min flow rate
 在 17.9 分钟 at 0.8 ml/min flow rate
 在 18.0 分钟 at 0.45ml/min flow rate
 在 18 min 100 % B
 在 19 min 0 % B

停止时间: 4 min
 流速: 0.45 ml/min
 柱温: 40°C
 Injection volume 1 μl standard
 Detector
 UV -DAD 338 nm and 266 nm
 Fluorescence
 Excitation wavelength: 230 nm
 Emission wavelength: 450 nm
 at 11.5 min
 Excitation wavelength: 266 nm
 Emission wavelength: 310 nm
 Photomultiplier gain: 12
 Response time: 4 s

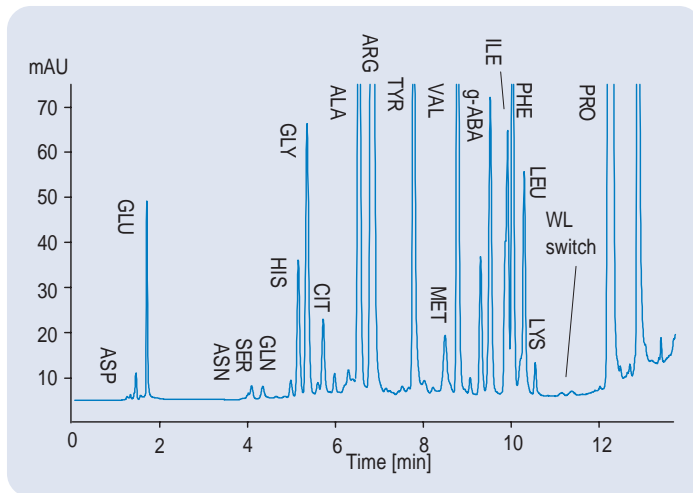


图 40

Injector program for online derivatization

1. Draw 3.0 μl from vial 2 (borate buffer)
2. Draw 1.0 μl from vial 0 (OPA reagent)
3. Draw 0.0 μl from vial 100 (water)
4. Draw 1.0 μl from sample
5. Draw 0.0 μl from vial 100 (water)
6. Mix 7.0 μl (6 cycles)
7. Draw 1.0 from vial 1 FMOc reagent
8. Draw 0.0 μl from vial 100 (water)
9. Mix 8.0 μl (3 cycles)
10. Inject

高效液相色谱方法评价

检测限: DAD < 5 pmol
 FLD < 100 fmol
 重复性:



22. "Sensitive and reliable amino acid analysis in protein hydrolysates using the Agilent 1100 Series", *Agilent Technical Note* 5968-5658E, 1999
23. R. Schuster, "Determination of amino acids in biological, pharmaceutical, plant and food samples by automated precolumn derivatization and HPLC", *J. Chromatogr.*, 1988, 431, 271 魏 84.



多肽的分析

利用毛细管液相色谱分析成年橡树籽中植物色素的肽图。

植物色素是光受体蛋白质，作用是控制植物中与光有关的发育孢子器。例如，蕃薯在漆黑的地下室里储存时，会长出浅色的芽。然而这个过程要是在有光的地方进行，就会长出绿叶和进行光合作用。植物色素在土豆中的含量极低，在样品制备以后的样品量就很少。在这种情况下，应该采用毛细管色谱柱，因为灵敏度会随色谱柱内径的减少而增加。使用内径为100–300微米的液相色谱柱，同时流动相流量为0.5–4.0 $\mu\text{l}/\text{min}$ 。此种条件也非常适合液相–质谱分析。

若要将常规液相色谱升级到毛细管液相色谱，成本较高，同时还要花较高的价格订购毛细管色谱柱。在毛细管液相中，有一个分流器，35-nL的毛细管流动池和用于连接用的毛细管。整个系统的总体积要尽量小。为满足以上的要求，采用了延迟体积低的1100二元泵。分流器，毛细管流动池和色谱柱可以从LC Packings 购买²⁴。

首先，设定标准流速(100 μl 或 50 $\mu\text{l}/\text{min}$)。上述流速可用已校正的分流器减至0.5 和 4 $\mu\text{l}/\text{min}$ 。这种是300 μm 毛细管色谱柱的最佳流速。

色谱条件

毛细管液相 / 紫外和质谱用于橡树籽中的植物色素的分析。图 41, 42 和 43 是紫外图和总离子流图两个峰的质谱图。安捷伦 1100 的液相系统无混合器, 所有连接管线尽可能短, 其内径为 75–120 μm 。

样品制备

提取的蛋白质在胰蛋白酶酶解之前, 先还原和烷基化。

样品:	植物色素的胰蛋白酶解产物 7 pmol/ μl
毛细管色谱柱:	300 μm x 25 cm, C18
流动相:	A = 0.025% TFA 水溶液 B = 0.02% TFA 乙腈
梯度洗脱:	0.35% B/min
流速:	100 $\mu\text{l}/\text{min}$ 分流至 4 $\mu\text{l}/\text{min}$
柱温:	25 $^{\circ}\text{C}$
进样体积:	2.5 μl
检测器:	UV-VWD, 206 nm (35-nl, 8-mm 流动池)

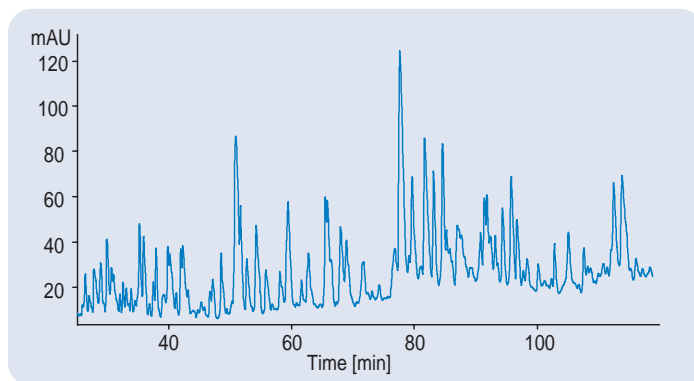
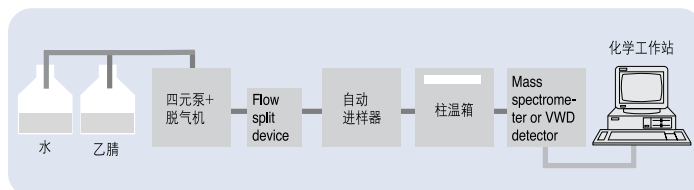


图 41

植物色素胰蛋白酶酶解产物的液-质分析(17.5 pmol) — 紫外图

高效液相色谱方法评价

检测限: 1 pmol





质谱图用于进一步的分析。某些胰蛋白酶的酶解的质量片段已经被标记出来。例如，图 42 所示，两个质谱图。

电压: Vcyl-5500, Veud-3500,
Vcap-4000, CapExt 150
扫描: 400-1800 m/z
域值: 150
取样(sampling) 1
步长 0.15 amu
干燥气: 氮气, 150°C
雾化汽水力: 氮气, < 20 psi

安捷伦 5989B 质谱仪

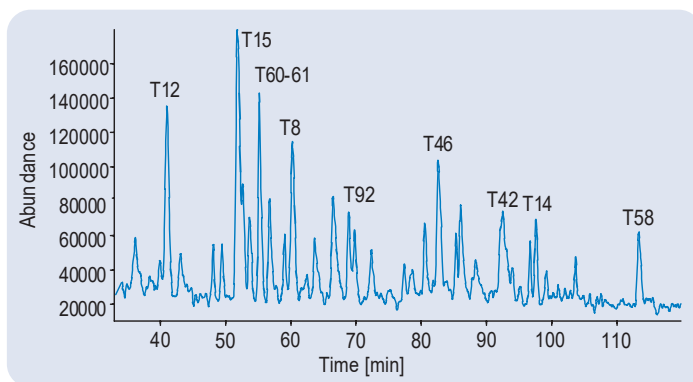


图 42
植物色素胰蛋白酶酶解产物的毛细管液相—质谱分析 (17.5 pmol)
—总离子流图

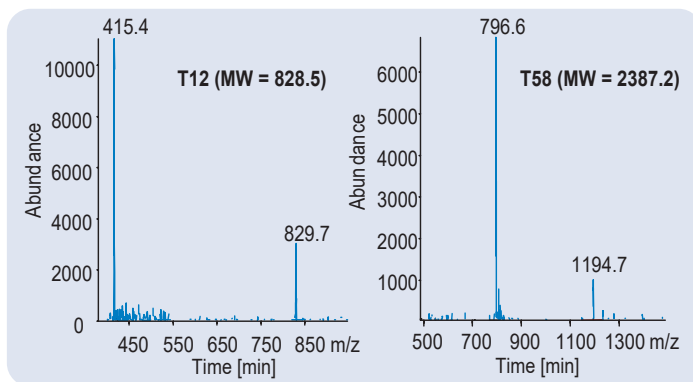


图 43
峰 42 和 43 的质谱图

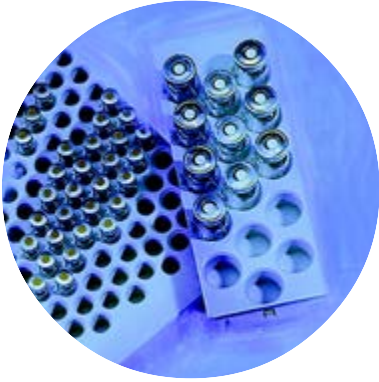


24. "Capillary Liquid Chromatography with the Agilent 1100 Series Modules and Systems for HPLC", *Agilent Technical Note 5965-1351E*, 1996.

分析仪器基础

第二部分

用于食品分析中
的高效液相色谱
硬件软件概述



第 4 章

液相分离





液相色谱可以提供各种形式的分离模式,同时可采用各种流动相来优化化合物的分离条件。

分离原理

固定相可以根据它们所分离分子的机理来分类:

- 分配相
- 吸附相
- 离子-交换相
- 体积-排阻相

目前,最常用的柱材料是反相的,其分离是通过在不保护的硅烷醇上分配和吸附来达到分离目的的。在液相色谱中,固定相是非极性的(或比流动相极性弱的物质),被分离的化合物一直吸附在柱上,直到有足够极性的溶剂或混合物将它们洗脱下来。

反相色谱

反相色谱材料具有非常广泛的应用和很长的使用寿命。而且,这些材料具有很好的重复性,低的平衡时间,很高的机械强度和可以预见的流出时间和流出顺序。反相色谱常常用于食品分析。

离子-交换色谱

与反相色谱相比,离子-交换色谱的材料的使用寿命较短,机械强度较差,和需要更长的平衡时间。这类色谱在食品分析中有一定的限制,主要用于无机阴离子,阳离子和草甘磷的分析。

体积-排阻色谱

体积-排阻色谱主要用于样品净化和馏份切割，有关其应用参见第五章(样品制备)

吸附基质

吸附色谱主要用于取样和净化。例如，植物中，黄烷酮可以用此方法净化，馏份切割和富集(用三氧化铝吸附)。其它的举例参见第五章。

窄径色谱柱的来临

高效液相色谱方法经常涉及所使用的色谱柱的内径问题。标准色谱柱的内径是4或5 mm，而窄径柱的内径是大约2 mm。当与常规内径柱的源料相同时，窄径柱可得到相同的分离能力，但是用更少的溶剂，因为被分析化合物可以在更低的流速条件下被洗脱出来。除此之外，窄径柱在与常规柱同样的进样体积下，其灵敏度高4-6倍见(图44所示)。

窄径柱的使用无疑对液相系统提出更高的要求。首先液相的泵必须具有能提供高精度高重复性流量的能力。其次，所有模块之间连接用的毛细管的延迟体积要尽量小。第三，由于色谱柱进口的滤头易堵，因此需采用保护柱。一个用于窄径柱的液相系统(低孔体积和高性能泵)可以获得更高的检测灵敏度，而且，节约更多的溶剂。然而，标准柱在同样的条件下具有更高的分析容量。

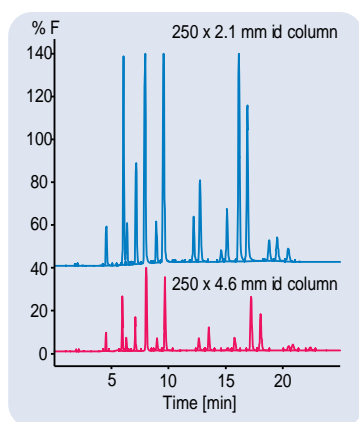


图 44



柱温对分离效率的影响

有许多分离除了与柱材料和流动相有关之外，还与柱温度有关。在这种情况下，柱温的稳定性是流出顺序的重要影响因素。安捷伦的液相使用帕尔贴(Peltier)温控的柱温箱可以保证色谱分离的高重复性。在24小时不间断使用的条件下，室温的周期性变化会影响色谱的分离效果，图45所示。结果显示用半导体控温的柱温优于传统柱温箱。

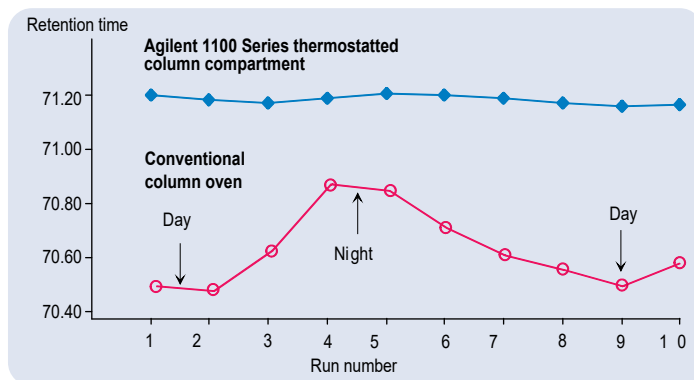
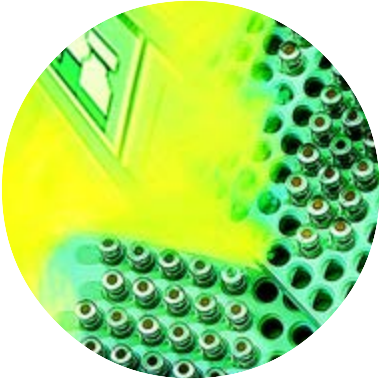


图 45
帕尔贴温控与常规柱温箱的比较。10次连续的进样的胰蛋白酶酶解的肽谱的保留时间的波动

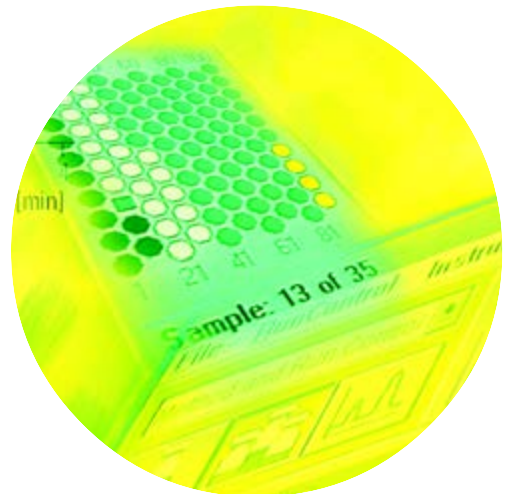
简述

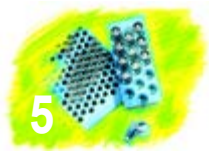
在食品分析应用中，反相固定相是最常用的液相介质。使用窄径柱可以获得更高的灵敏度同时节约溶剂。例如，这些柱子成功地用于黄曲霉素和脂肪酸的分析。



第 5 章

样品制备方法





如何从复杂的基体中分离出目标化合物对于食品分析成功与否是非常关键的。在分析研究中，根据样品基质的多样性和复杂性，要考虑多种样品净化和富集的方法来达到样品的分离目的。

样品制备过程

要进行高效液相色谱分析，要考虑以下步骤：

1. 取样—采样和储存

2. 净化 / 富集(脱机)

均质，离心，沉淀，水解，液 / 液萃取，固相萃取，超声波液相萃取，超临界萃取，浓缩。

3. 在线净化 / 富集

保护柱，在线固相萃取，凝胶过滤色谱。

4. 化学衍生化

柱前衍生：脱机或在线

(也可参见第9章的柱后衍生化的讨论)

自动化

手动萃取，净化和浓缩是整个分子过程最耗时的。若有可能，尽量使这个过程自动化。目前，样品可以实现自动馏份收集和衍生化。

超临界萃取和自动固相萃取也可以直接连到液相色谱仪上。目前，可以与液相连接并能自动操作的有

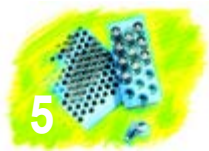
- 阀-切换阀可用于保护柱和在线固相萃取装置的自动切换。阀在液相中也普遍，安捷伦的仪器已将阀装入柱温箱中。例如，液相上的六通阀，洗脱物可从一个色谱柱切换到另一个色谱柱上，进行峰切隔。然后，这峰再在第二个柱上进行分析。
- 超临界萃取-这种技术相对较新，在线的超临界萃取正在研发中。脱机的超临界萃取已成功地用于婴儿奶粉配方中的维生素 K 分析²⁷。
- 柱前衍生化-这种技术已普遍被接受而且也已商品化，如用于啤酒中的氨基酸分析(参见 50 页)。反应试剂也可在柱后添加(参见 28 页)²⁹。
- 自动固相萃取-这是一种相对较新的技术，已用于啤酒的分析中。

固体

固体食品如巧克力或肉类食品首先应该均质化，然后再采用如蒸馏，超临界萃取或超声波萃取技术进行样品制备³⁰。

超声波萃取

超声波萃取是一种简单的萃取方法。通过采用合适的溶剂，达到选择性提取某些化合物的目的。若食品基质是低脂肪的，可用此方法提取抗氧化剂和防腐剂。



✓	✗
使用的有机溶剂少，从而节约成本和减少废液处理的成本	若食品是高脂肪的基质，此种方法不适用。

蒸馏 蒸馏只能是从均质化的固体基体提取挥发性化合物。例如，联苯和乙-苯基苯酚农药可以利用此技术从水草中提取出来³¹。

✓	✗
可以选择性提取挥发性有机物	萃取时间较长，而且脱机操作应用范围窄

超临界萃取 目前为止，超临界萃取在食品分析中使用很少。但是，现代超临界萃取装置可以与液相色谱连接，并进行自动操作。这种方法以前主要用于气相^{26, 32}，目前也用于液相色谱仪上。

✓	✗
使用有机溶剂量少，因此减少成本或处理废液的成本。萃取时间只需几分钟，也可以自动化。	溶剂化能力较弱限制了应用范围。对于痕量分析时，超能的液体并不容易得到，而且很贵。

液体

液-液萃取，包括脱机和在线模式，和凝胶过滤色谱已用于液体的样品的分析或从固体样品的萃取物分析。

液-液萃取

液-液萃取是最普遍使用的萃取方法。它要求适当的溶剂和分液漏斗，可以连续或是逆流分配装置。



简单，需要选择高的改进剂(pH, 缓冲盐或离子对试剂)

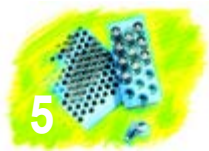


需要消耗大量的有毒有机溶剂，经常出现乳化和，很难实现自动化操作。

固相萃取

适合于净化清的液体，例如经过过滤的饮料，固相萃取原理很简单。样品首先被吸入通过已条件化的固相小柱或圆盘。固体吸附剂将目的化合物保留在柱上，然后用少量的有机溶剂洗脱出来。可以选择各种吸附剂来用于不同化合物的提取。可以用两个或更多的固相小柱来保留样品中的每一个组份。

固相萃取是发展最快的一种样品制备和净化技术³⁴。目前，已经可实现与色谱代连结并自动化操作。整个系统由机械手和阀系统组成。利用泵抽取一定体积的样品，通一个或几个装有添料的预柱，从而萃取和富集目标化合物。用适合的溶剂洗脱被吸附的化合物，然后进入液相或气相色谱进行定性和



定量分析。预柱可以根据分析要求自动切换，从而防止阻塞和“记忆”效果。目前，这种装置已被用于河水中农药和多环芳烃的分析。另外一种不同的在线固相萃取系统也被用于啤酒中氨基酸的分析^{36,40}。



有机溶剂的消耗量少一次可以萃取多个样品，还可以自动操作



批与批的效率的不同会影响分析的重复性。会发生不可逆的吸附，导致样品的丢失。有时会发生表面催化降解反应。

凝胶过滤色谱

也称为体积-排阻色谱，凝胶过滤色谱已经成为从高分子量的基质中(脂肪或油)分离出低分子量化合物的标准方法。分离的基础是化合物的分子的大小，也就是高分子的化合物先可低分子量的化合物流出。凝胶过滤色谱已成功地用于婴儿奶粉配方中的维生素 A, D 和 E 与甘油酯的分离，以及调味品中农药的提取(参见第二章，22 页)。³⁷



重复性高，自动化程度高



溶剂消耗大，分离效率可能随每一批的不同而有所差别

保护柱 保护柱连接在分析色谱柱的前端，用于防止分析色谱受到基体的污染。保护柱既可以包括在分析柱中也可以利用阀进行切换使用，通过阀切换，将目标馏份切换到分析色谱柱中进行分析。后一种技术，应用灵活，可用于样品的净化和富集。另外，反吹可以将样品在预柱上富集。阀再切换之后，将富集的化合物从预柱上切换到分析柱上。



重复性高，自动化程度高



若使用阀，系统复杂而且成本高

小结

许多食品分析都是由官方认可的方法，包括详细的样品制备方法。最近，趋向发展自动化的样品方法，以减低由于手工操作带来的误差。但是，若要开发更新的更先进的样品制备方法，必须符合满足标准的优良实验室规范(GLP)要求³⁸。



第 6 章

进样技术





在样品制备过程完毕之后。进样到色谱中时，分析过程就开始进行。鉴于目标化合物的浓度，需要一定可靠的样品体积。使用高精度的自动进样技术可以提高分析生产力及精确度。

一个好的进样装置应具有的特点

对于进样器的主要要求是：优良的进样精度，低记忆效应(每一次进样时上次进样的残留量)，能够抽取粘度大的样品而且进样体积可调。现在的取样系统还可以进行如在线柱前衍生，加热和冷却和微量进样从而进一步增加进样器的能力。在分析中，某些分析需要腐蚀性溶剂。如0.1N 盐酸或60% 甲酸的流动相，因此一些公司可提供抗腐蚀的钛金属材料以解决此类问题。

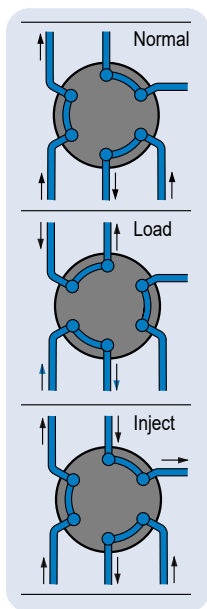


图 46

进样器一般是由一个六通阀组成，通过几个不同的转动位置完成进样。取样过程，如图 46 所示。第一步，为上样，取样可以通过真空(用在自动进样系统)或针的推杆(在手动阀上)将样品导入样品环，然后阀转动到进样位置。第二步将柱和流动相相连。因为系统的所有的部分在分析过程中一直在被冲洗过程中，因此前一种的样品残留几乎全被除去，而不会被带入到下一次进样中。

在色谱柱上分离的好坏会受到进样质量高低的影响，快速而尖锐的进样峰会得到窄而重复的色谱峰。尽管减少进样器与柱之间的联接会减少定量环中的样品向流动相里扩散。因此可使用被称之为低孔体积的联接件。这些联接无“孔体积”或不必要的空隙以避免溶剂和样品共混。

手动进样器

在许多实验室里，手动进样器以其低廉的价格和操作简单的优点而非常普遍。配备精确的进样针，操作者可以利用进样口在常压下充满定量环。进样阀的转子转动到“进样”位置，由原来的流动相将定量环中的样品带入色谱柱。在操作过程中，连续不断的清洗使得进样口和阀保持干净状态，而无一次进样的样品残留。



经济，成本低



无法自动化，不能在线衍生。进样针必须脱机清洗



自动进样器

自动进样器也包括与手动进样器一样的六通阀，但是是由机械控制的。控制可以是气动的或电动的。在自动进样器上，装有定量装置可以进行0.1–1500微升的进样。若带有大容量的定量环，自动进样器可以完成高至5 ml的进样。带有微量体积的样品瓶，可以进行1–5微升的进样。甚至进样针插入样品瓶的位置也可以由计算机软件控制：如将针插入两层的下层取样或上层取样。利用这种技术，若选择合适的仪器，粘度大的样品也可以被分析。在这种进样中，移动针的活塞的时间将适当延长，以获得高重复性的液面移动。



进样重复性高。完全自动化。
流动相保护进样器的所有部件，
防止每次进样之间的混合导致的误差。



价格贵

可以进行样品预处理的自动进样器

自动进样器可以进行在线柱前衍生，稀释小量样品和添加内标。通过帕尔贴或液冷可以对进样器进行控制，以防止不稳定的样品分解。另外，也可以加热，进行化学反应。一般商品化的自动进样都具有以上的功能。

化学衍生化

正如在后面第八章里讨论的那样，若目标化合物没有发色团以及检测技术不够灵敏度，因此在这种情况下，需要进行衍生化。在反应过程，色谱发色团通过衍生化试剂加到目标化合物上。衍生化可以在柱前或柱后进行，从而提高灵敏度和选择性。柱前衍生化是首选的方法，因为它不需要额外的泵，而且反应试剂可以与样品按比例添加而无需连续添加。自动柱前衍生可以得到很好的精度。而且，自动进样器可以处理微升级的样品，这一点对只有极少样品的情况极为重要。自动进样器的工作原理如图 47 所示。

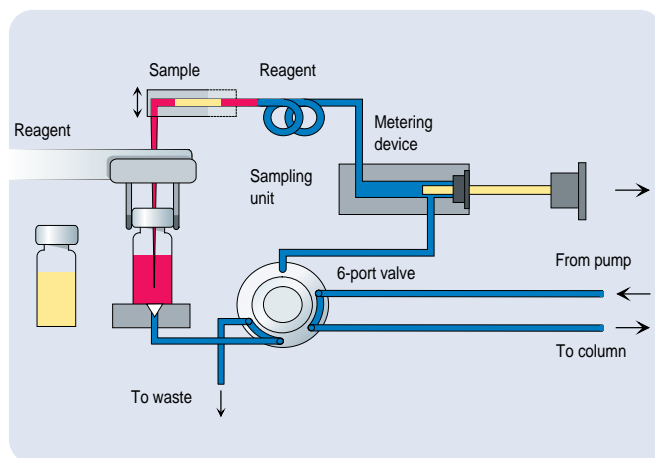


图 47

自动进样器的机械传输臂可以依次移动样品瓶和几个反应试剂瓶。



进样器将一段样品和衍生化试剂取入毛细管中。进样针的活塞前后移动将样品和反应试剂混和。使用合适的软件，自动进样器可以静止一段时间使得衍生化反应完成。若反应需要几种试剂，自动进样器需要编程，也就是它按次序从不同的反应试剂瓶中取样进入毛细管。在这种复杂的样品处理中，进样针必须在瓶与瓶之间进样时保持清洁状态，如可用装有蒸馏水的瓶洗针。

小结

自动进样器与手动进样器相对具有很明显的优点，其中最重要的是具有进样体积重复性高的特点。样品的处理量也非常大。现代的自动进样器还可以进行在线样品处理和衍生化。对于食品分析，自动进样器是最佳的选择。



第 7 章

液相泵和 脱气机





泵对液相色谱的性能好坏是至关重要的。其性能在很大程度上与混合溶液，即流动相的流速有关，因为这个因素会影响峰的保留时间和面积。数据的重复性直接影响对峰的定性和定量结果的准确性。在本章中，我们将讨论泵的操作，包括溶剂的预处理以及它对操作性能的影响。

现代液相色谱泵的特点

一个现代的液相泵应该具有以下几点：无脉动，流速精度高，流量范围宽和孔体积小。另外，它可以控制更高的压力以及至少两种溶剂混合梯度，还有控制梯度的精度和范围。

流量范围 在此将讨论两种梯度泵：一种是流量在0.2–10 ml/min之间(低压梯度混合)，另一种是流量在0.05–5 ml/min(高压梯度混合)。

梯度洗脱 在分离食品中多组份时，使用特定溶剂组成(恒梯度)的流动相，方法达到要求的柱选择性，因此不能分离每一个峰。通过增加第二种或第三种溶剂的比例，增加洗脱强度来提高色

谱柱的峰分辨率，这种方法有两种。第一，分离分辨率提高，但是没有延长洗脱时间。第二，利用梯度使得峰的来峰宽变窄从而减少了操作时间，最终可以在给定的时间内，分析更多的样品。在柱前形成梯度的溶剂可以通过泵后高压进行或在泵前低压进行。

在高压下形式的梯度

若混合是加压之后进行的，这就是高压梯度混合(最常用的办法利用两个等梯度泵，每一个泵输送一种溶剂，然后混合完成的)。



可以获得很快的梯度而快速转换溶剂(100% A 到 100% B)无需脱气(对于常规分析来讲)



价格贵。需另外安装低混合噪音的 200 μ l 混合器。

低压梯度混合

在低压混合时，溶剂的混合在流路的前部进行，在泵加压之前。



价格相对便宜，可以混合两个以上的流路。无混合器，因此混合噪音小



必须加脱气机



用梯度的泵设计

低压混合梯度泵

在食品分析中，泵的性能是很关键的，例如，前面所述的低压梯度泵和高压梯度泵都可根据分析的要求而定。前者具有一个双柱塞的装置用于低压混合，而后者具有两个双柱塞装置用于高压混合。经过在线脱气机后，流动相通过电动主动进样阀进入第一个泵腔(见图48)。主动阀可使腔体容易充满，而且可以避免泵阀被粘住或受到污染。从第一个柱塞流出经过第二个阀，然后经过低孔体积的脉冲阻尼器(带压力传感器)进入第二个柱塞。从第二腔体内流入，取样单元和色谱柱。泵中的柱塞是马达驱动的，而且固定 180° 的相位差。

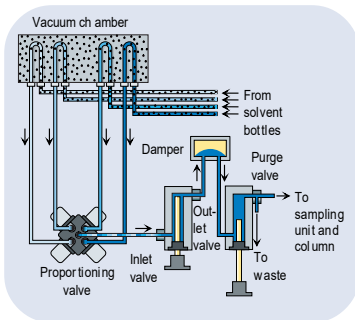


图 48

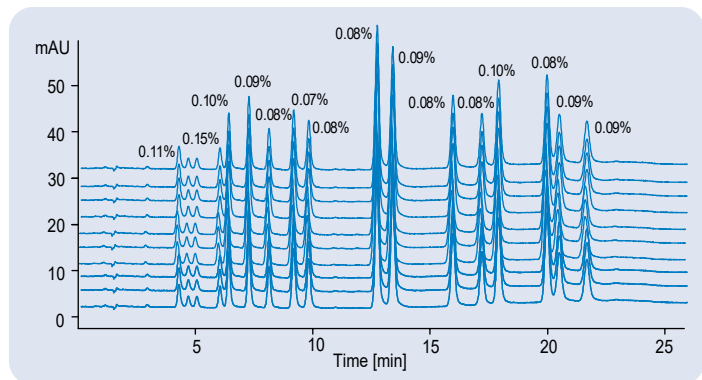


图 49
样品为多环芳烃标样，10次进样的峰的保留时间的相对标准偏差(RSD%)

这样，当一个在输送流动相时，另一个在充满流动相。在每一个冲程的替代体积可以减低，从而优化在低流速下溶剂组成的精度。配有溶剂的压缩因子，自动补偿，低孔体积脉阻尼，系统的脉冲波幅就会减至最小，最终可以获得高重复性的保留时间和峰面积(见图49)。宽的流量范围(最大到10 ml/min)和800–1100 μl 的孔体积可以使用窄径，标准内径和半制备的色谱柱。同时也同时进行四种溶液的梯度混合。

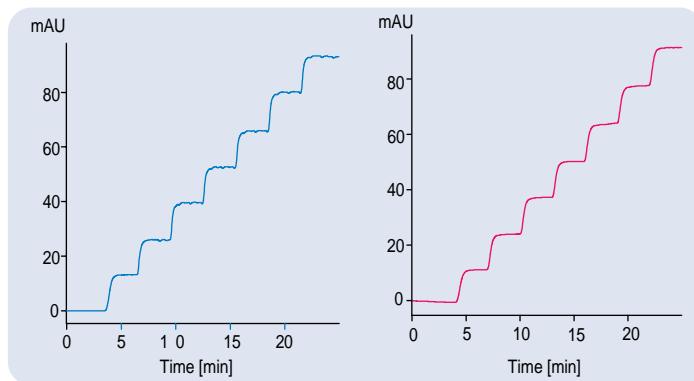


图 50
高压梯度泵(左)和低压梯度泵(右)的条件，阶梯梯度组成(0-7%)变化的结果

Performance of low-pressure pump design

Flow precision	< 0.3 % (typically < 0.15 %) based on retention times of 0.5 and 2.5 ml/min
Flow range	0.2 到 .999 ml/min
Delay volume	ca. 800-1100 μl
Pressure pulse	< 2 % amplitude (typically < 1 %), 1 ml/min propanol, at all pressures
Composition precision	± 0.2 % SD at 0.2 and 1 ml/min

在这种泵的设计中，在低压条件下，通过高速比例阀可以混合最多四种溶剂，从而获得理想的梯度。阀与柱塞同步运动，在泵吸液过程中，进行溶剂混合。溶剂在腔体的底部进入，在柱塞与腔体壁之间向上流动，同时，产生波动。与传统的固定冲程的多溶剂泵，安捷伦的可变冲程的泵大大提高了梯度的精度，甚至在低流速时，也具有优良的精度(见图 50)。



高压梯度泵 (安捷伦 1100 泵系列)

Performance of high-pressure pump design

Flow precision	< 0.3 %
Flow range	0.05-5 ml/min
Delay volume	180-480 μ l (600-900 μ l with mixer)
Pressure pulse	< 2 % amplitude (typically, 1 %), 1 ml/min isopropanol, at all pressure > 1MPa
Composition precision	< 0.2 % at 0.1 and 1.0 ml/min

安捷伦 1100 高压梯度泵包括有两个双柱塞泵头，两个泵头串接相连。这种连接大大减少仪器的空间，以及连接管路的孔体积。两个泵头的两个柱塞是伺服控制的，以满足在梯度混合时色谱条件的要求(见图 51)。

在低流速条件下，三个因素会保证梯度的精度。低孔体积，180–480 μ l 的内体积(不包括混合器)，最大的溶剂组成稳定性和保留时间精度，还有一般以 50 μ l/min 的流速为起始流量。

同样标准，来确定溶剂组成精度及二元泵的脉冲波幅(见图 50 和 52)。通过进行跟踪梯度的实验，可以测定孔体积。就体积过大会使峰变宽，结果降低分析的选择性。他们同时也会增加采集时间循环，尤其在低流速时，更严重。

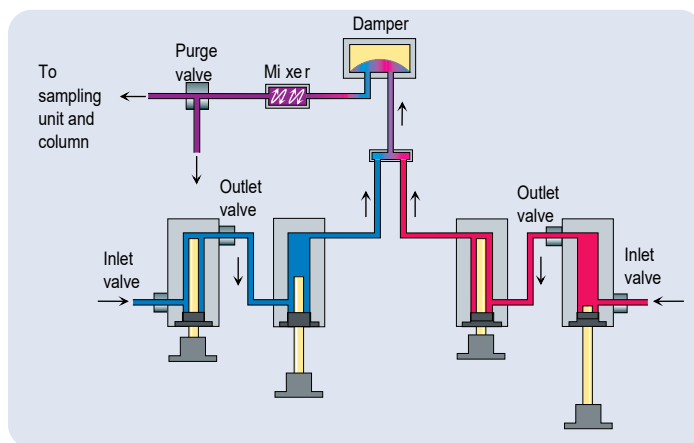


图 51
安捷伦 1100 二元泵的高压梯度的示意图

在最低检测限条件采集数据时，应该使用混合器以减少混合噪音，尤其是在吸收波长为 210–220 nm 以及流动相含有四氢呋喃(THF)时，更要使用混合器。在 1 mm 内径的色谱柱上，采集肽图时，对泵有严格的要求，因为梯度组成的一点点变化会导致保留时间很大的变化。在流速为 50 $\mu\text{l}/\text{min}$ 时的梯度条件下，溶剂在每一个通道的传输精度必须在 1 $\mu\text{l}/\text{min}$ 。一个平稳的基线和无干扰的梯度的获得取决于优良的混合器和低孔体积。如图 53 所示，肌球蛋白蛋白酶酶解产物六次进样的色谱图，其峰的保留时间的相对标准偏差在 0.07–0.5% 之间。

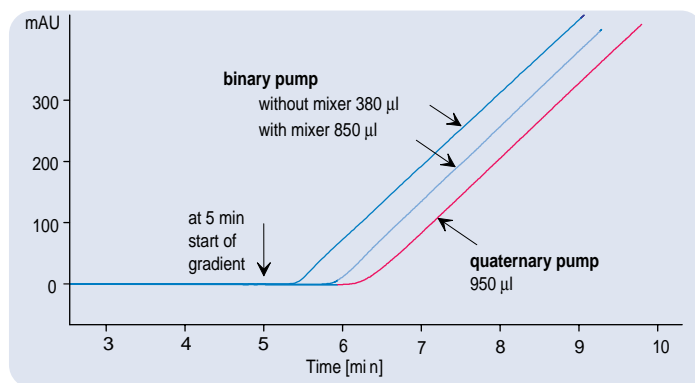


图 52
高压和低压梯度泵的孔体积

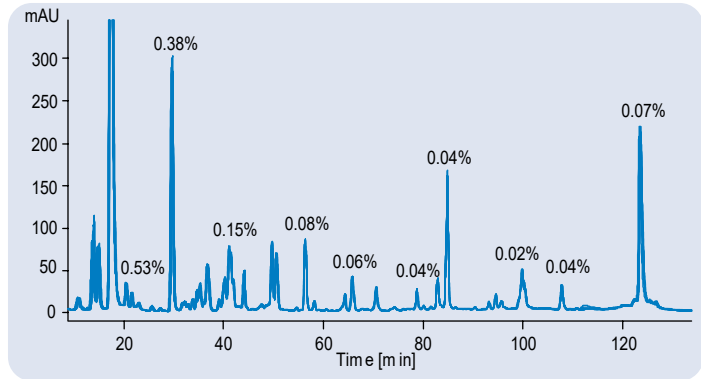


图 53

肌球蛋白胰蛋白酶酶解产生的六次进样的色谱图的叠加图，保留时间的相对标准偏差低至 0.07-0.5% 之间

脱气

脱气是指溶剂在进入柱之前，除去溶在其中的气体。脱气可以防止在流路中形成气泡，并且去除由于气泡产生的替代体积和对梯度混合的影响，提高分析系统的性能。流速不稳会影响化合物在色谱柱上的保留时间，增加噪音而且影响流动敏感型的检测器的分析。大多数的溶剂会溶解氧气，结果会损害检测器。破坏作用包括增加噪音，紫外检测器基线漂移，造成荧光检测器淬灭和电化学检测器还原模式操作时，溶解氧的还原作用导致的高背景噪音(在氧化模式，这种作用极小)。

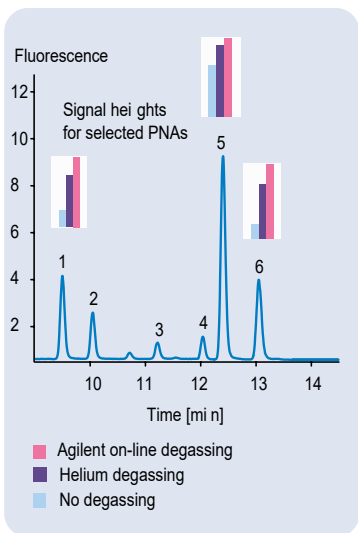


图 54
 氦气脱气或真空脱气会恢复
 由于荧光淬灭造成的信号损失

氧气在荧光检测器分析多环芳烃中的影响最明显，结果如图 50 所示。在流动相中的溶解氧越少，越少，淬灭减少，灵敏度就越高。

一般来讲，脱气有三种模式：在线或脱机真空脱气，脱机超声波脱气，或在线氦气脱气。其中在线脱气由于具有以下特点而被认为是首选方法：无需预备溶剂，溶解的气体浓度恒定，在整个操作中，都可以维持在最低量。在线氦气脱气和在线真空脱气是两种最常用的模式。

氦气脱气

在氦气中，氦气连续通过溶剂瓶鼓泡。这种过程可使溶剂饱和和从而迫使其它的气体只到达顶部。

✓	✗
只需压力调节器。可以同时几个通过脱气，元额外的孔体积。	成本高。挥发性溶剂损失会导致组成随时间变化。氧气的脱气效率不如真空脱气。



真空脱气

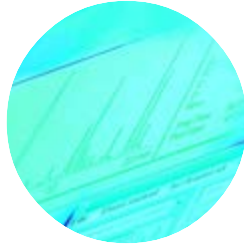
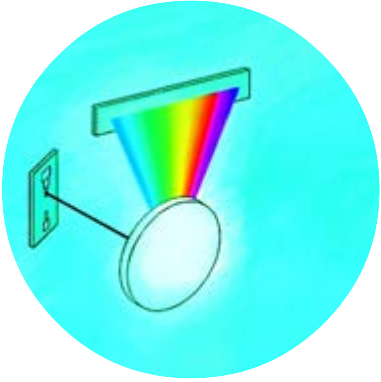
在真空脱气过程中，溶剂通过由特殊聚合物制成的渗透膜管路，这些管路在真空下只允许气体渗透出去，而保留液体。



管路内外的压力差, 实现溶剂连续脱气。新的低内体积($<1 \mu\text{l}$)的脱气机可实现溶剂快速转换。

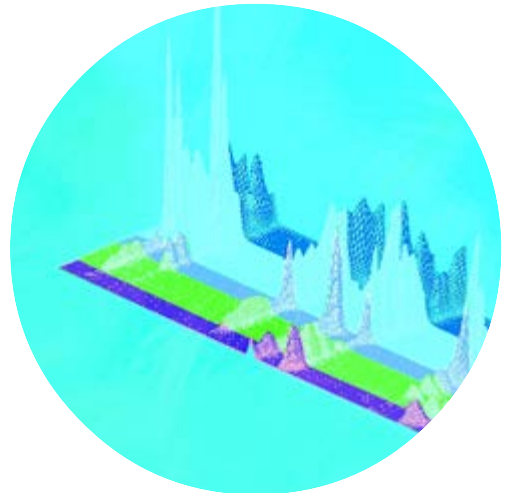
小结

可根据洗脱模式(等梯度或梯度)和柱内径(窄径或常规柱内径)来选择液相泵。尽管等梯度泵常常能满足需要, 但是梯度泵的应用更灵活。而且梯度分析系统可以减短分析时间, 适合复杂基质的样品分析, 能使峰形变尖锐, 能提高分离分辨率, 可利用其它的溶剂通道, 进行系统自动清洗。安捷伦 1100 的泵极适合从 0.05 到最高到 10 ml/min 的流量范围, 因此色谱柱可选用 1 mm 至 8 mm 的内径。尽管许多官方认为的方法都是采用标准内径的柱系统流速, 但是发展趋势是应用窄内径的色谱柱。窄径柱的溶剂耗量小, 同时减少废液, 最终降低了分析成本。



第 8 章

检测器





目前HPLC使用的大多数检测器也可以应用于食品分析。每种检测器均有优缺点。例如：二极管阵列检测器和质谱检测器可以提供谱图信息，但如果把这两种检测器应用于日常分析，需要权衡这两种检测器的费用。

由于使用紫外光谱可以确认某些食品和它们代谢物及衍生物，所以紫外吸收检测器成为最常用的检测技术。然而，当分析样品需要高灵敏度和高选择性时，荧光检测是很好的选择。尽管电化学检测器也应用于高灵敏度和选择性的检测，但电化学检测器很少在食品分析中应用。另外，电导检测器对阳离子和阴离子的检测具有很高灵敏度和选择性，热能检测器对于检测低于10ppt浓度的亚硝胺具有很高的灵敏度。如果上述检测器均不适用或被检测样品浓度很高时，可以选择示差检测器。

分析参数

用于食品分析最重要的参数如下：

- 检测限(LOD)和定量限(LOQ)。
- 检测线性。
- 选择性。
- 定性信息。

检测限和定量限

分析系统的检测限和定量限取决于检测器的基线噪音和漂移。检测器的绝对检测限可以通过直接进样来确定。通常绝对检测限表示为最小检测限，有时被定义为基线噪音。但是，LOD 不仅仅决定于仪器，它同时与流动相的含氧量，进样系统，峰形扩展，以及系统温度差异有关。如果把这些因素考虑进去，LOD 被定义为 2~3 倍基线噪音。LOQ 被定义为 10~20 倍基线噪音。紫外检测系统可以测量低于 500 pg 浓度的样品。如果检测波长优化后能匹配尽可能多化合物的消光系数，对于食品中化合物例如抗氧化剂，LOD 可以低于 100 pg。荧光和电化学检测器可以检测到非常低的 pg 范围。液质联用的检测限依赖于所使用的接口类型。如果使用电喷雾接口，其检测限可以达到 pg 级。示差检测器通常适用高于 500 ng 样品的检测。

选择性

检测系统的选择性定义为：在复杂介质中，利用特定化合物的性质对其进行选择检测的能力。如果检测器对于影响分析定量的共流物没有响应，则检测器具有选择性。



对于被检测的化合物，通过设置适合的检测波长及较窄的谱带宽度，紫外检测器也可以成为选择性检测器。但是与荧光检测器和电化学检测器相比，紫外检测器的选择性还是比较低。对于一些特定化合物，它们的响应是有选择性的。依赖于分析什么样品，质谱即可以是选择性检测器，也可以是通用型检测器(扫描方式)。示差检测器是通用型检测器。

线性 检测器的响应可以表示为动态范围和线性范围。动态范围是指在可记录的测量特性(吸收度, 电流等)范围内, 最高浓度与最低浓度的比值。在实际工作中, 线性范围被更广泛的使用。线性范围是指被测物的浓度范围, 在此范围之内, 检测器的响应是线性的。把不同浓度样品的响应与它们对应的浓度作图, 在一定浓度范围之内会得到一条直线。通常线性范围只占动态范围的十分之一。紫外检测器的线性范围最大可以达到 10^5 , 而荧光检测器和电导检测器只有 10^2 , 质谱通常线性范围为 10^3 , 示差检测器线性范围为 10^4 。

定性信息 色谱法中比较经典的定性手段是质谱图。然而由于液质联用仪器非常昂贵, 所以它的使用受到限制。如果被分析化合物的紫外谱图有明显的区别, 二极管阵列检技术可以定性。荧光检测器和电化学检测器只能用保留时间作定性。

紫外检测器

图 55 是传统的可变波长检测器的光路图。从氘灯发出的多波长光被聚焦到单色器的入口狭缝，单色器选择性地传输一个窄谱带的光到出口狭缝。从出口狭缝出来的光通过流通池，部分被流通池中的样品吸收。样品通过流通池的光强度与没有通过流通池光强度的比值就是样品的吸收强度。

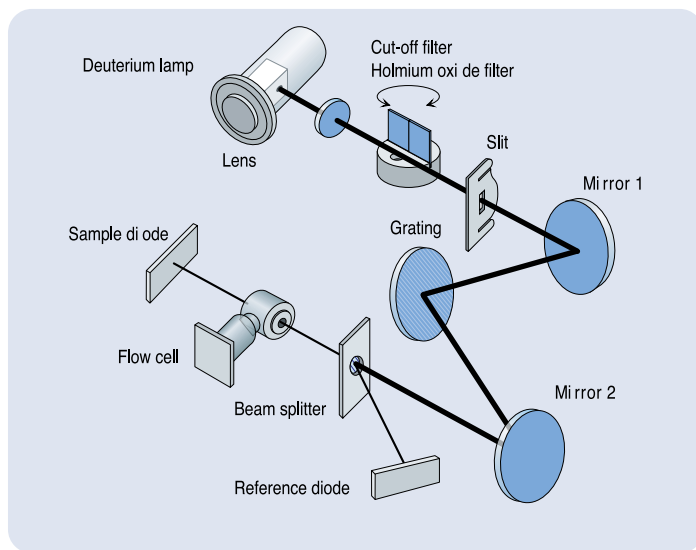


图 55

大多数可变波长检测器通过分光器分出部分光到达参比光电二极管。参比光电二极管用于补偿光源的波动。为了优化选择性，



紫外检测器可以在整个检测过程中程序变换检测波长。紫外检测器在某一时刻只检测某一特定波长。然而在实际工作中，需要同时检测不同的吸收波长，例如当两个化合物不能从色谱上进行分离，但两个化合物有不同的最大吸收。如果需要测量一个化合物的整个吸收谱图，需要停泵扫描，因为扫描时间比样品流出时间长。



灵敏度: 通过测量每个峰的最大吸收波长获取最大灵敏度。一些仪器配备停泵扫描功能。

单个波长检测不能提供足够的信息。没有谱图，不能进行定性。

二极管阵列检测器

图 52 为二极管阵列检测器(DAD)示意图。消色差透镜系统把从氙灯和钨灯发出的多色光聚焦到流通池。

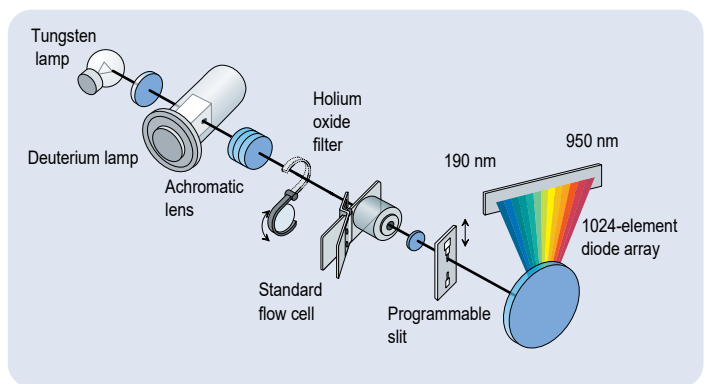


图 56
二极管阵列检测器

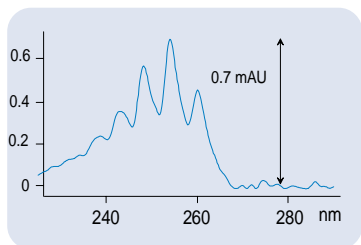


图 57

	Conventional	DAD
Signal acquisition	1	8
Spectra acquisition	stop flow	on-line

三维数据

通过流通池的多色光到达全息光栅后被分成单色光，然后投射到二极管阵列。不同厂家的波长范围也不同。图 52 所显示的检测器由于使用双灯设计，波长范围从 190 nm 到 950 nm。

图 52 所示检测器，阵列由 1024 个二极管组成，每个二极管测量非常窄的波长范围。通过测量在整个波长范围内，不同波长的吸收强度，可以获得吸收的紫外光谱图。一个二极管所检测的谱带宽度取决于入口狭缝宽度。在我们的例子中，入口狭缝宽度可以从 1 nm ~ 16 nm 程序选择。如果需要高灵敏度，狭缝宽度可以设置为 16 nm，以便最大的光通量通过。如果需要紫外谱图的分辨率，狭缝可以设置为 1 nm。在这种情况下，可以检测到苯的精细结构(见图 57)。与传统紫外仪器相比，二极管阵列检测器光学系统中流通池与光栅的位置正好颠倒，所以我们称二极管阵列检测器为倒光学系统。传统紫外检测器与二极管阵列检测器最明显的差异在左表中列出。

二极管阵列检测器配备适合的数据处理系统，可以对不同化合物进行检测波长优化。可以通过 3 维图或不同保留时间的等吸收图(见图 58)，非常方便地看到不同化合物最大吸收波长。图 59 说明了分析抗生素的优化结果。由于具有采集和存贮谱图的能力，用户可以创建电子谱库，以便在方法开发过程中进行化合物定性。

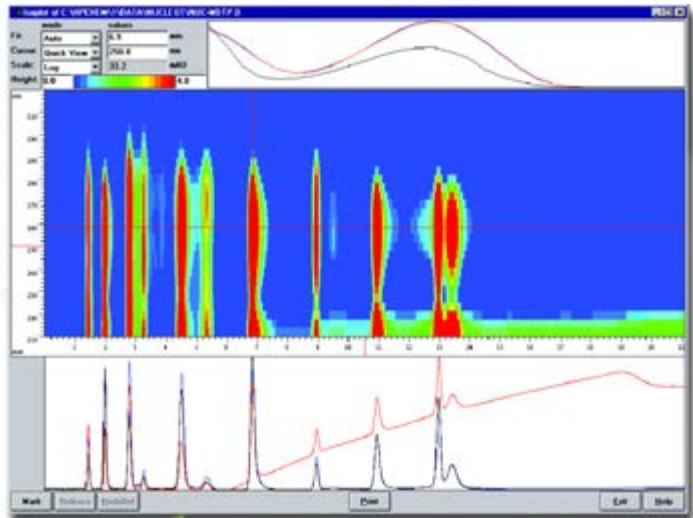


图 58

多信号检测可以在整个光谱范围内优化灵敏度。然而图 58 的光谱轴显示,单波长不能在最高灵敏度下检测所有的抗生素。

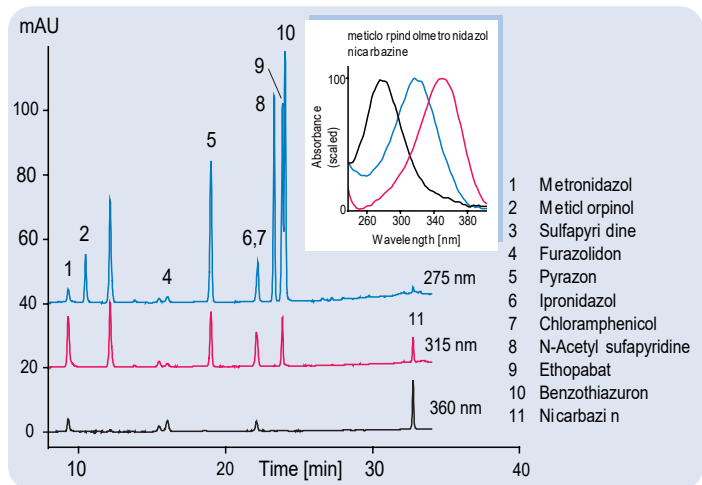


图 59

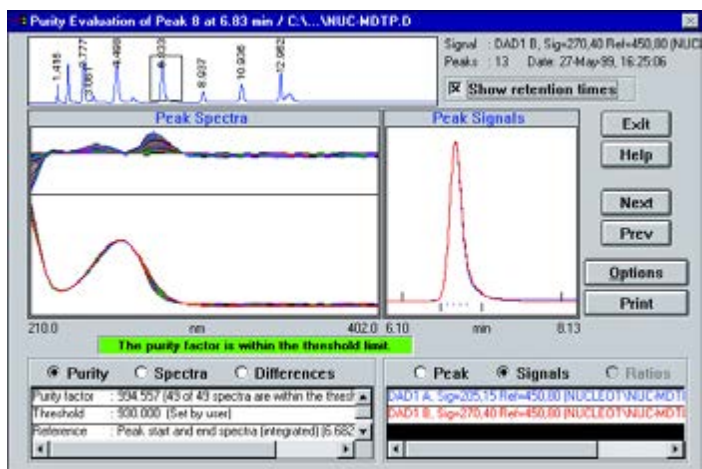


图 60

由于多数食品样品的复杂性,峰纯度检测可以降低定量错误。峰纯度分析最流行的方式是:在峰流出过程中,被采集的几个光谱图进行比较。归一化后被重叠显示,重叠的光谱图可以通过肉眼进行比较,也可以通过计算机计算后进行比较。图 60 显示了抗生素分析的峰纯度结果。如果在方法开发过程中创建了谱库,可以利用谱图进行定性。每次分析结束,样品光谱图可以通过交互式或自动地与谱库中谱图进行比较。



图 61 显示了样品的定量及定性结果。这本初级读物部分内容包含了 DAD 的几个应用实例。

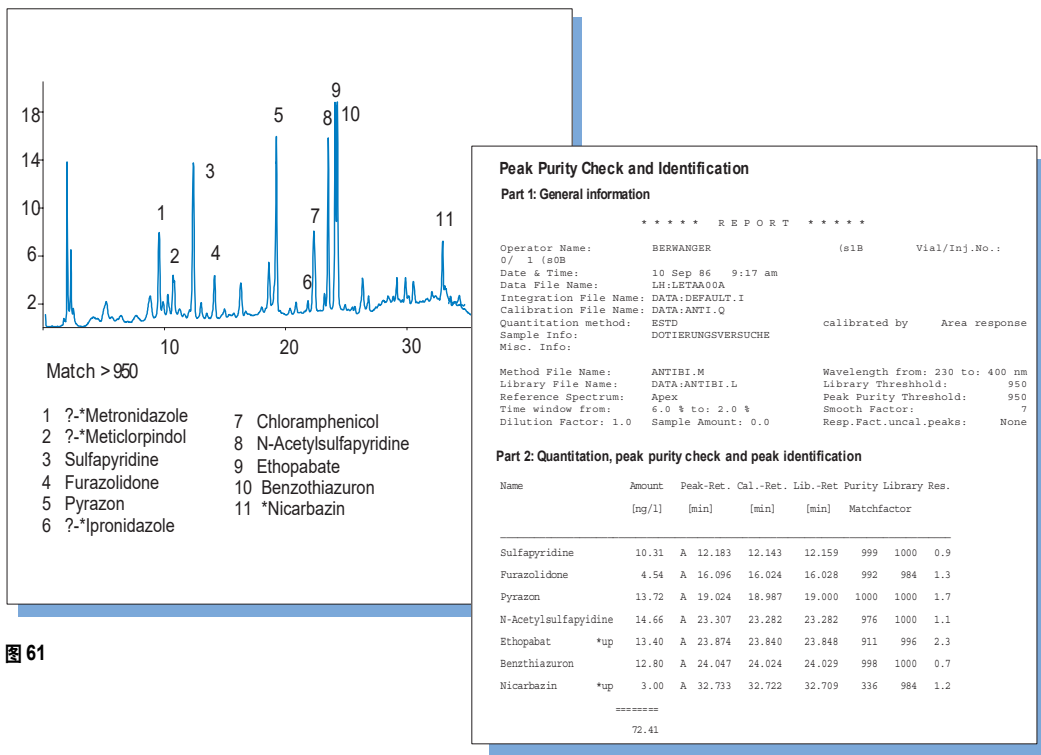


图 61

✓ 能够进行最大峰纯度检测及定性,可以测量多波长,采集光谱吸收以及进行谱库检索。

✗ DAD 适用于通用型检测而不是高灵敏度分析(而荧光检测器和电化学检测器更适用)

荧光检测器

荧光是发光的一种特殊类型。它是特定分子将以前在激发过程中吸收的能量释放出来的过程。荧光检测器比某些检测器例如紫外检测器灵敏度更高。因为不是所有分子都能吸收能量并释放能量。由于背景噪音低，荧光检测器比其它吸收类型检测器更灵敏。大多数荧光检测器被装配在与入射光成一定角度(一般是直角)的方向上记录荧光。这样的装置降低了杂散的入射光作为背景干扰检测的可能性，保证了达到灵敏检测水平的最大 S/N。

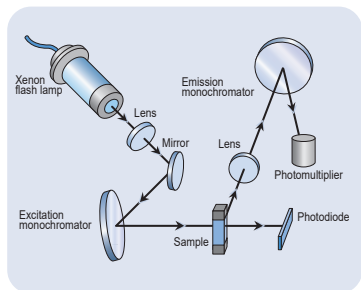


图 62

图 62 是安捷伦 1100 系列最新荧光检测器光路设计示意图。一个闪烁氙灯提供在紫外范围内激发的最大光强。氙灯只点燃几微秒以提供光能。每次闪烁使得流通池内样品产生荧光，在色谱图上产生一个单独的数据点。由于氙灯在检测器工作的大部分时间是关闭的，它的使用寿命可以达到几千个小时。氙灯不需要预热时间就可以得到稳定的基线。全息光栅作为单色器将氙灯发出的光分散。需要的波长被聚焦到流通池产生最佳激发。为了减少从检测器激发一侧来的杂散光，光路被装配到与入射光成直角的方向记录。另外一个全息光栅作为发射单色器。这两个单色器都在可见光范围内有最佳的光通量。

光电倍增管是测量低强度发射荧光的最佳选择。由于闪烁灯本身每次闪光的强度的差异，一个基于光电二极管的参考系统测量激发光的强度，然后触发检测器信号补偿系统。



截止滤光片

由于大多数最大发射波长高于 280 nm，一个截止滤光片(图中未画)阻止低于这个波长的杂散光进入到发射光单色器的光路。固定的截止滤光片和谱带宽度(20 nm)避免了硬件的检查和包括一个带有可拆换的滤光片和狭缝的仪器所需的文档工作。

信号谱图模式

激发和发射单色器能够在信号和光谱模式间切换。在信号模式，它们被移动到一个特定位置，这个模式对应于需要的波长，这就象一个传统的紫外检测器。由于所有数据点都是在一个激发和发射波长处得到，这种模式提供了最低检测限。

在线谱图测量 和多信号采集

激发和发射光谱全扫描对于方法开发非常有用。然而只有在激发光路和发射光路中都有马达驱动的光栅才可实现。有些检测器可以传输这些数据至工作站，然后贮存这些数据。一旦使用扫描光谱确定了最佳的激发波长和发射波长，检测器在分析过程中可以在这些波长之间进行波长的程序切换。

光谱模式用于得到多信号或者光谱信息。闪烁灯的点燃与激发或发射单色器的旋转是同步的。用于光栅的马达是长寿命的，就象PC机高速硬盘使用的马达一样。当光栅旋转到一个正确位置时，氙灯被点燃，发出一个闪光。闪光持续时间小于2毫秒，而光栅的转动花费小于14毫秒。由于单色器跟着旋转，光谱模式的灵敏度损失比传统的双波长紫外检测器小很多。

多信号 对于PNA分析，可以使用多信号同时检测而不使用波长切换。使用不同的4个激发波长，所有的15的PNA都被监测到(图63)。

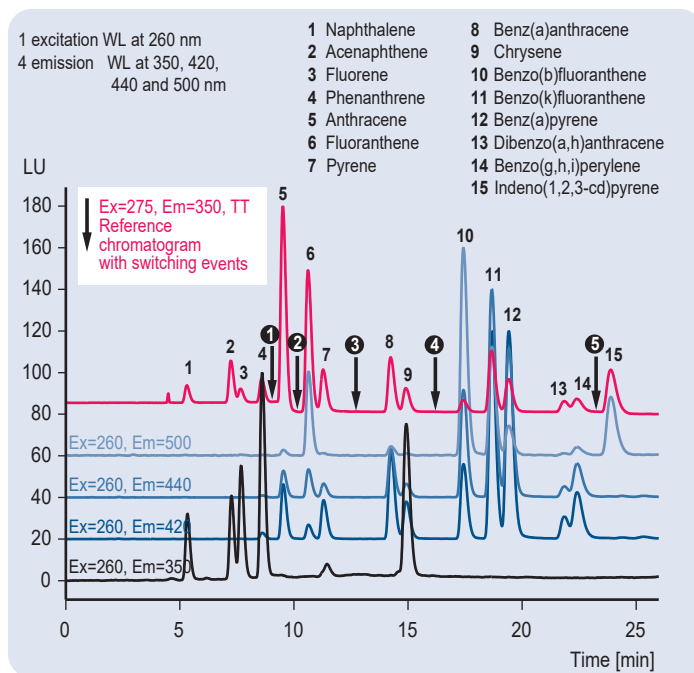


图 63

- ① Ex/Em = 260/420 nm
- ② Ex/Em = 270/440 nm
- ③ Ex/Em = 260/420 nm
- ④ Ex/Em = 290/430 nm
- ⑤ Ex/Em = 250/550 nm



优点: 闪烁氙灯可以降低由于热传递造成的基线漂移, 荧光标记可以提高检测灵敏度。
缺点: 荧光光谱通常不能用于峰识别。

电化学检测器

电化学检测是基于在氧化还原中的电子转移: 氧化过程中分子给出电子, 还原过程中分子得到电子。氧化还原在工作电极表面上进行。无论化合物被氧化还是被还原, 反应速度依赖于工作电极与包含溶质的溶液的电势差。根据能斯特方程确定的氧化还原电势与活化能的关系, 可以确定反应速率。氧化还原电流正比于电极上发生反应的数目, 反应数目又是界面附近被分析化合物的浓度的量度。

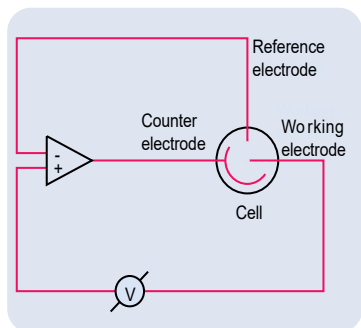


图 64

在检测过程中, 使用三个电极: 工作电极, 电化学反应发生在该电极上; 对电极, 和工作电极构成电极对, 所加电压为流动相和工作电极间的电势差; 参比电极, 对洗脱电导率的变化进行补偿(见图64)。参比电极读数反馈到对电极, 以便在峰洗脱过程中电流通过工作电极的时候保持恒定的电势差。

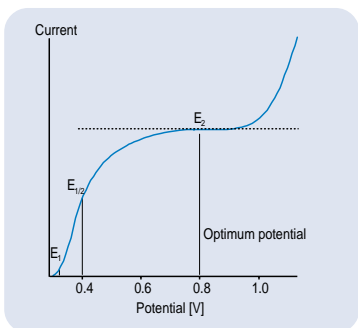


图 65

检测器的响应由电流的放大和后续的信号转换产生。应用当今先进的电子技术可以测量皮克级甚至更低数量级的化合物所产生的电流。尽管电化学检测器只能检测那些具有电化学活性的物质，但在分析复杂食品样品时，这种局限事实上又成为一大优点，因为它提高了检测的选择性。为了确定最佳工作电极电势，对于每一个化合物都需要考察检测器响应(电流)和所加电势(电压)的关系，作出如图 65 所示的电流-电压曲线。在电势低于 E_1 时，因为所提供的能量不足，氧化反应不能发生。电势增加到 $E_1/2$ 时，电极表面分子将有一半被电解。最大响应需要一个仅略高于 E_2 的电势。这一电势对应的电流为极限电流，电压进一步提高会增加噪音而影响检测过程。

电极材料

工作电极可以使用几种材料，最常用的是玻璃电极。这些材料还包括金(测定糖类和醇类)，铂(测定亚硝酸盐，亚硫酸盐，肼和过氧化氢)，银(测定卤素)，铜(测定氨基酸)，汞(还原模式下测定硫代硫酸盐)和金汞齐(还原模式下测定含氮有机物)。

流通池外观

文献中已经描述了大量流通池的设计图案。大多数可以归纳为三种主要类型之一：薄层设计，壁射流设计和多孔溢流设计。多孔溢流设计与另两种有显著的差异，这种设计保证电量检测过程中电极表面的反应产率为 100%。其它设计中使用电流检测，只有 1~10% 的效率。电流检测通常更加灵敏，所以通常首先选择电流检测。



电化学检测器可以使用 1 微升流通池，非常适用于窄内径的 HPLC。

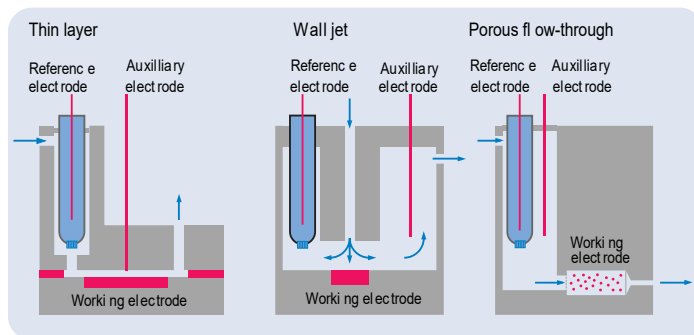


图 66

自动化程序

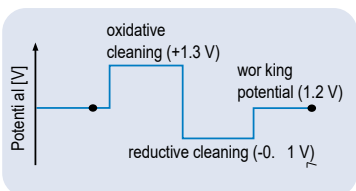


图 67

直到最近，电化学检测器技术仍被认为难于应用，而且用于常规分析时不够稳定。然而，最近的一些进展使得电化学检测器可以用于常规分析，例如临床研究中儿茶酚胺的分析和实验室中的常规检测。在测定间隔中，甚至在峰洗脱过程中（例如使用金电极分析糖类），使用基于脉冲电流的自冲洗过程可以提高稳定性（见图 67）。

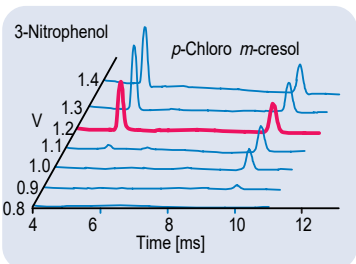


图 68

虽然可以通过评价混合物中每种化合物的伏安图优化混合物的最佳电势，实际上这些优化步骤可以通过使用自动增量模式自动完成。HPLC 在进行一系列的进样过程中，程序增加电势（由起始电势，中止电势和电势增量参数确定），就象图 68 所示。在此过程中，漂移传感器帮助确认在下一次分析开始时，阈值与上一次相同。（见图 69）

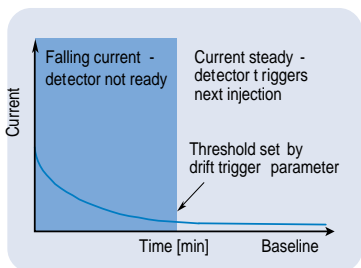


图 69

如果流通池表面电极被严重污染，流通池必须卸下，取出电极并在强酸或其它合适的清洗剂中清洗。现代化的检测器可以非常方便地进行拆卸。这本初级读物部分内容包含了电化学检测器的几个应用实例。

质谱

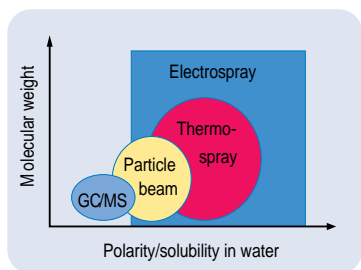


图 70

液相色谱对于复杂样品的定性存在很大困难。通常共流出化合物可以通过DAD进行定性，但由于紫外谱图差异性小，所以用这种方法定性不是十分特征。荧光检测技术可以提供比DAD特征的检测，但对于大量不同化合物的分析，荧光检测也不能给出理想的结果。使用质谱检测器，可以针对几种不同分析类型的样品给出确切的鉴定。虽然GC/MS在食品分析中已经是一个非常完善的技术，但是LC/MS在此领域仅仅是刚出现的一个有力的工具。基于GC的分析仅适用于那些具有挥发性和热稳定性的化合物(见图70)。然而许多化合物是不挥发的，而且极性大，热稳定性不好。这些化合物通常使用LC进行分离，而且改进的LC/MS接口的出现使LC/MS更加常用。



HPLC	MS
High pressure liquid phase separation	High vacuum required
Produces large quantities of volatilized solvent (100 镑 000 ml/min gas)*	Typical MS vacuum systems designed for low ml/min gas load
No mass range limitation	Depends on masss/charge and mass range of analyzer
Can use inorganic buffers	Prefers volatile buffers

* About 1000-fold increase going from liquid to gas phase with typical LC solvent

API 接口

然而质谱检测器与 GC 的连接比和 LC 连接容易得多。左侧表中列出了 LC 与 MSD 操作条件的不同。早期使用直接液体注射和传送带接口连接 LC 和 MS, 但 these 方法分析效率低和可靠性差。在 80 年代, 热喷雾和离子束接口改善了 LC/MS 的应用范围和可靠性。然而灵敏度低, 质量范围窄, 对样品极性的要求以及频繁的仪器维护限制了这些接口的使用效率。最近, 两种大气压(离子化)接口 - 电喷雾和大气压化学电离 - 已经几乎完全替代了热喷雾和离子束技术。这些接口可以分析分子量范围及极性范围很宽的化合物, 而且灵敏度高, 可操作性强, 并且延长了仪器维修的周期。在实际工作中, 选择合适的 LC/MS 接口主要取决于样品的极性, 分子量以及热稳定性等因素。

在电喷雾接口中, 洗脱物直接通过喷雾针到达高电压场, 并且在此形成离子(见图 71)。然后带电离子被干燥, 并且随着带

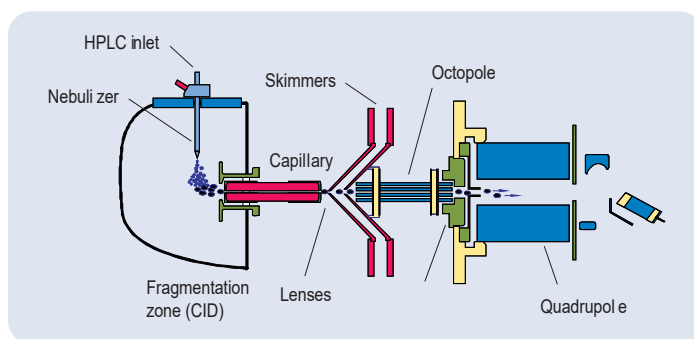


图 71

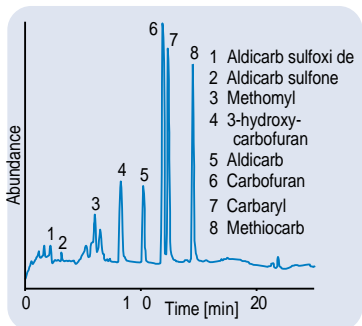


图 72

电液滴的收缩，分析物离子被释放出来。离子通过一系列真空段和离子聚焦后进入质量分析器。

电喷雾离子化可以对大分子化合物例如蛋白质和酶产生多电荷。由于质量分析器是依据质荷比对离子进行分离，所以分子量范围只有几千而且低成本的质谱检测器就可以分析超过150,000道尔顿的化合物。电喷雾的主要应用是分析较高分子量的化合物。然而这种技术也可以用于分析分子量小的极性化合物。图 72 显示用电喷雾对氨基甲酸盐进行分析。

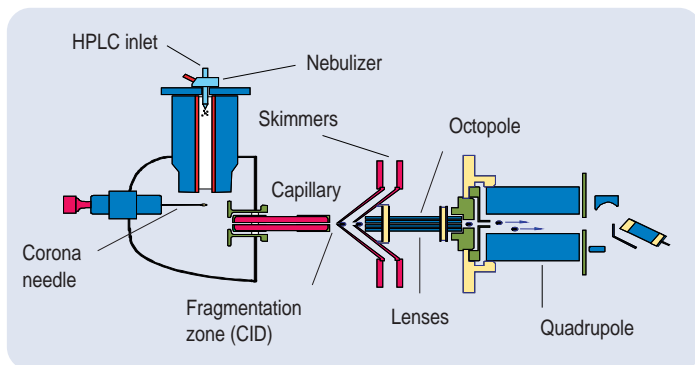


图 73

APCI 用于分析中等极性的化合物。象电喷雾一样，APCI 离子化是在大气压下的化学电离(见图 73)。

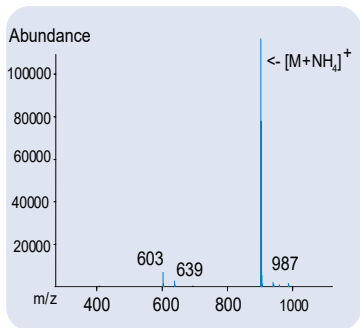


图 74
Mass spectrum of the fatty acid
triolein (C18:1, [cis]-9)
molecular weight = 884.781
molecular formula = $C_{57}H_{104}O_6$

APCI 需要化合物具有挥发性，不适合分析热不稳定性化合物。图 74 是典型的甘油三酯质谱图。通过 $[M + NH_4]^+$ 离子 (对应质量数 $M + 18$) 可以确定不饱和度及侧链脂肪酸的长度。内源 CID 有助于确定色谱峰的脂肪酸成分。全扫描方式可以容易地鉴定低于 ng 级的化合物。如果需要准确的定量，使用选择离子方式 (SIM)，SIM 方式的检测限低于 pg 级。



可以分析极性、半极性，分子量高达 150,000 的化合物。高灵敏度。很强的分子离子。碎片依赖于内源 CID 参数。

处理多电荷分析物的复杂多相混合物十分困难。溶剂会干扰离子化过程。

示差(折光)检测器

示差折光检测器基于样品池中溶液和参比池中纯流动相折光指数的差异。因为洗脱液的组成在整个分析过程中必须保持恒定，因而这种检测器不适于梯度洗脱。主要有四种类型的示差折光检测器：Snell 偏转型，Fresnel 反射型，干涉型及 Christiansen 效应型。第一种类型检测器使用双检测池设计，是目前最常用的示差检测器。最新 Agilent 1100 示差检测器的检测限可以低于 ng 范围。由于示差检测器灵敏度低，而且会随温度变化产生基线漂移，所以主要用于糖类及非芳香酸的分析。



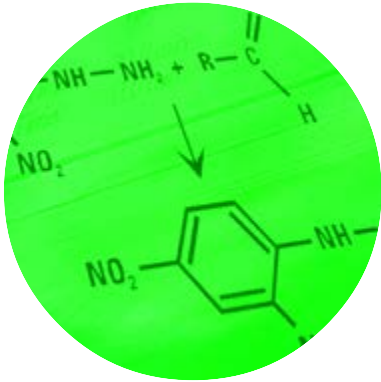
通用型检测器

灵敏度低，不能进行梯度洗脱

In brief.

下列表格回顾了本章讨论的检测技术 – 您的选择反应了在期望结果与投资之间的一种平衡。

检测器	灵敏度	选择性	优点	应用
紫外可变波长	+	-	花费低	有机酸, 经过衍生的脂肪酸, 无机阴离子
二极管阵列	+	+	峰纯度、定性	抗氧化剂, 防腐剂, 香料, 颜料, 抗寄生虫药, 毒枝菌素, 杀虫剂, 维他命, 经过衍生的胺
荧光	++	+	高灵敏度	人工甜味剂, 毒枝菌素, 维他命, 氨基甲酸盐, 草甘磷
电化学	++	+	高灵敏度	维他命, 无机阴离子
质谱扫描方式	-	++	结构鉴定	氨基甲酸酯, 油脂
质谱 SIM 方式	++	++	高选择性	杀虫剂, 蛋白质
示差检测器	-	-	通用	糖类, 非芳香酸



第 9 章

衍生化



当分析物浓度非常低时，使用样品化学衍生的仪器可以提高结果的灵敏度和选择性。正如第六章讨论那样，这种仪器可以进行柱前和柱后衍生。在本章，我们将详细讨论应用于食品的化学衍生以及它们所适用的检测技术。

添加紫外-可见发色团

使用衍生化试剂标记化合物使紫外吸收变成一种非常流行的衍生技术。衍生试剂的选择要使反应产物具有最大的紫外吸收，这样不但提高灵敏度，而且提高选择性。这种结合减低了来自于反应试剂、副产物和原始溶媒的干扰。下表列出常见化合物和反应。在这本书中，我们给出了化合物衍生的一些例子，包括脂肪酸和氨基酸。

目标化合物	衍生试剂	λ	
酒精	-OH	异氰酸苯酯 $C_6H_5N:CO$	250 nm
可氧化的硫化合物	SO_2^-	2,2'-二硫代二(5-硝基-吡啶)	320 nm
脂肪酸	-COOH	对-溴苯甲酰甲基溴化物	258 nm
		2-樟脑油溴化物	250 nm
醛类和酮类	-CO-COOH, =C=O, -CHO	2,4-二硝基苯肼	365 nm
伯胺	-NH ²	邻-苯二醛(OPA)	340 nm
伯胺和仲胺	NHR	9-苄基甲基氯甲酸酯 (Fmoc)	256 nm

荧光标记的添加

荧光是一个高灵敏度、高选择性的检测技术。在食品分析中，某些化合物的检测浓度非常低，需要对这些物质进行荧光衍生才能检测。下表中列出常用荧光衍生标记物。本书给出氨基甲酸酯⁴¹和草甘磷⁴²的应用实例。

目标化合物		标记试剂	λ
酒精	-OH	异氰酸苯酯	λ_{ex} 230 nm, λ_{em} 315 nm
伯胺	-NH ₂	邻-苯二醛 (OPA)	λ_{ex} 230 nm λ_{em} 455 nm
伯胺和仲胺	NHR	9-苄基甲基氯甲酸酯 (FMOC)	λ_{ex} 230 nm λ_{em} 315 nm

柱前还是柱后衍生?

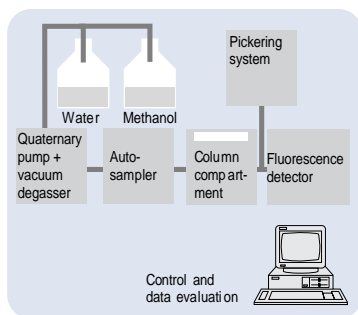


图 75

柱前衍生即可以离线操作也可以在线操作,但要使分析准确,柱后衍生一定要在线操作。在柱后衍生过程中,反应试剂只能通过例如泵这类辅助仪器添加(见图75)。辅助设备同时包括混合及加热装置。柱后衍生会增加系统死体积,造成峰形的扩展。虽然在使用标准口径柱,流速大于1 ml/min条件下,这种扩展没有什么影响,但柱后衍生不适用窄口径液相色谱柱。

自动衍生

使用现代液相色谱仪，柱前衍生和柱后衍生技术均可自动完成。自动进样器的单步机械功能可以在分析之前进行编辑，然后贮存在进样器的程序中。这些单步程序包括吸取样品和衍生试剂，然后进行混合。柱前衍生完全可以使用窄口径色谱柱，如果使用窄口径色谱柱，信噪比可以提高5倍，而且溶剂消耗量比标准柱要大大降低。本书中有关脂肪酸分析的章节将说明这个原理。

1	Draw	1.0 μl	from vial 12
2	Draw	0 μl	from vial 0
3	Draw	1.0 μl	from vial 8
4	Draw	0 μl	from vial 0
5	Draw	1.0 μl	from sample
6	Draw	0 μl	from vial 0
7	Mix	8 cycles	
8	Draw	1.0 μl	from vial 12
9	Inject		

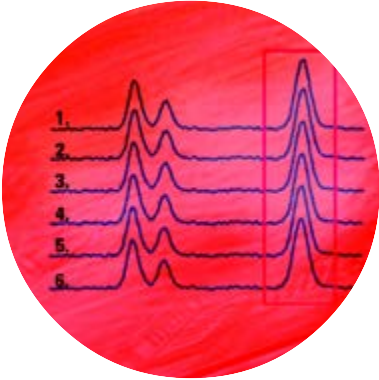


衍生可以提高痕量物质的可检测性。衍生可以自动完成并与整个分析成为一个在线的整体。许多化学家开发了用于日常分析的柱前、柱后衍生方法。

需要在仪器上进行额外的投资。

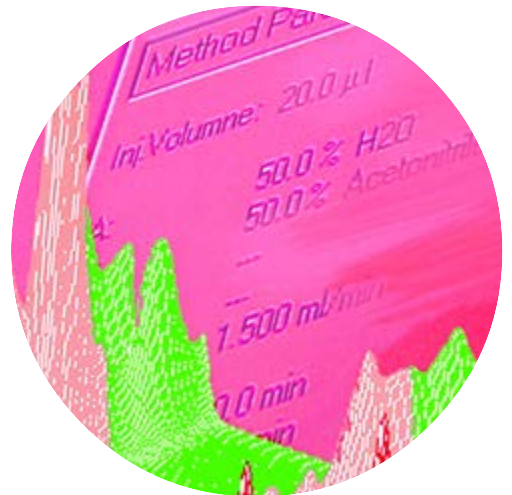
小结

衍生可以提高分析物的响应，对食品分析非常有益。化学修饰剂可以自动地在样品分离之前或分离之后添加。在柱前衍生中，使用有样品预处理能力的自动进样器(见第6章)，而柱后衍生则需要在检测器之前，使用额外的泵把反应试剂引入色谱系统。后者增加了系统死体积，所以不适用第4章中涉及的窄口径技术。



第 10 章

数据采集和 处理技术





无论在您的实验室中选购什么检测系统,但仪器采集的数据一定要处理。各种各样的计算设备可以完成数据处理的任务。数据处理设备的花费取决于报告结果的需要及所需自动化的程度。

根据个人需求,越来越复杂的技术应用于处理色谱数据:最简单的是使用条带图形记录仪,其次是积分仪,然后是带工作站的个人电脑,最后是高级网络数据处理系统,我们通常称之为NDS。关于计算过程和计算结果,由美国EPA和德国DIN官方公布的方法提供了详细的信息,但他们均未推荐使用什么仪器。

条带图形记录仪

传统上使用条带图形记录仪与仪器连接记录一段时间的数据。它在一定大小的记录纸上跟踪记录仪器的响应变化并给出最基本的结果。在电子数据传输年代,它已被数据处理设备所替代,这种数据处理设备使用预先编辑好的程序对结果作出判断,例如设置一段时间窗口,在此期间所有色谱峰不进行积分。



便宜



不记录保留时间,不生成在线定量结果,不同分析之间没有基线复位,没有电子文件存贮。

积分仪

相对条带图形记录仪而言，积分仪有几点优势，所以积分仪成为数据处理最基本的标准仪器。积分仪可以提供满刻度的色谱图和多种报告格式。峰面积百分比，归一化，外标法和内标法几乎成为现代积分仪最基本的定量方法。报告中列出样品的浓度，保留时间，计算类型（基于峰高计算还是基于峰面积计算），积分参数以及测量日期。高级功能还可以在后处理图形时自动绘制基线和显示检测器响应的校正曲线。积分仪与仪器之间用遥控线连接，可以序列执行多样品分析。大多数积分仪可以存贮原始数据，用于日后重新绘图或重新积分。一些积分仪具有计算机编程功能，例如，可以使用BASIC编程语言执行更高级的数据统计计算。多信号通道积分仪可以满足分析方法中对两个或多个检测信号的需求。



便宜。非常方便的给出保留时间以及定量结果的报告，而且还可以自动基线复位。 不能进行仪器控制，没有用户化报告。

个人计算机

近年来，在分析实验室中个人计算机已经成为越来越流行的数据处理工具。计算机比传统的数据存贮方式具有更灵活、更好的存贮能力。而且，一些功能例如文字处理，数据表格分析以及数据库的操作可以同时在线执行(见图 76)。通过计算机网络，实验室的仪器可以联网，这样实验数据进行中心归档并且可以共享打印机。通过把中心归档过程分配给多个处理单元，可以节约软件认证时间，基于用户端/服务器的软件具备扩展网络能力。通过计算机，使用键盘和鼠标就可以对 HPLC 系统进行控制。HPLC 系统包括泵、检测器、自动进样器所有部件的参数均可通过软件程序设置并存贮到硬盘，而且还可以打印成文件。一些 HPLC 软件程序包括诊断测试步骤、仪器认证步骤以及扩展的仪器日志，所有这些功能为不同的法规部门进行认证带来极大的方便。虽然这些补充的功能与仪器控制没有直接关系，

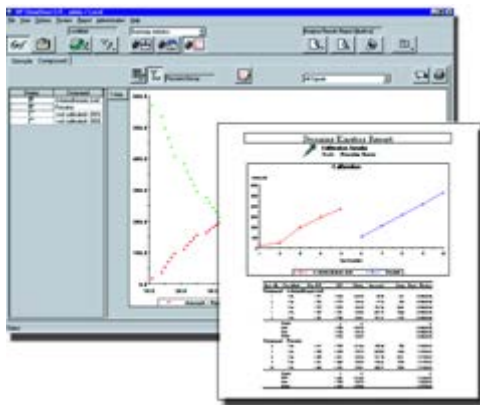


图 76

但这些功能被编辑成软件比直接控制仪器要简单得多。事实上,许多GLP/GMP的许多要求都被加到每个新版本软件中,并随 HPLC 仪器一起销售(见图 77)。例如,在一些色谱软件中,原始数据不仅仅被存贮成信号数据,而且一个二进制保护文件还存贮仪器参数(系统压力,温度,流量和溶剂组成)以及各种分析方法的信息,例如积分事件、校正设置及运行过程中以时间为标记的各种事件的日志。另外,有了谱库的帮助,化合物定性不只依赖于色谱图,还可以依据化合物谱图特征进行定性。这种定性过程完全自动执行,可以节约分析时间而且不需要用户干预。

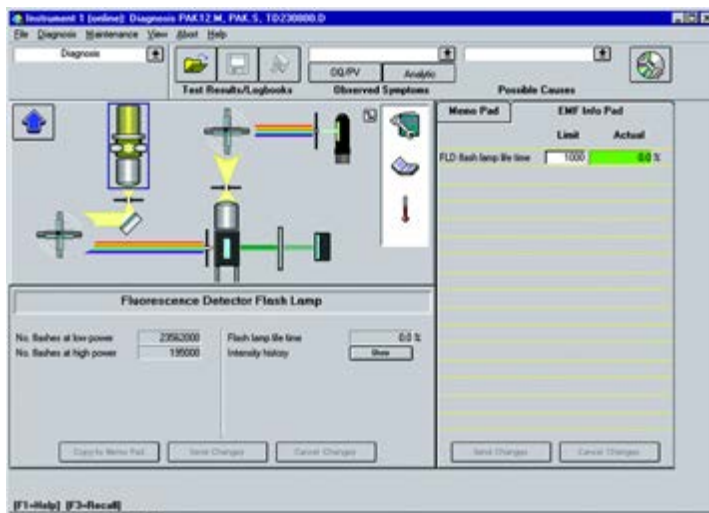


图 77



单台计算机使用适合的色谱软件可以同时处理来自多个检测器的信号。针对不同媒介、不同检测浓度样品进行灵敏度和选择性优化时，这种功能尤其有用。例如在分析多核芳烃时，紫外检测器和荧光检测器串联使用。计算机同时显示色谱信号和谱图，可以对数据进行信息解释。峰纯度软件可以帮助判断流出峰是否含有杂质。

灵活的程序可以提供标准报告和用户报告。例如，一些色谱软件可以生成峰纯度报告和通过谱库检索得到的定性报告，对于比较复杂的分析，还可以生成系统适应性报告。任何计算机生成的报告可以打印也可以存储成其它格式的文档。计算机可以非常方便地对校正表进行修改，对数据进行重新积分。但软件必须对重新处理数据的过程进行跟踪记录，以满足 GLP/GMP 的要求。

通过计算机可以编辑序列列表，针对不同分析参数不同的样品进行自动分析。在序列完成之后，计算机可以根据设置要求自动关闭泵，柱温箱和检测器的灯。如果仪器出现故障，软件会对仪器实施保护，防止流动相损失，避免不必要的开灯时间。好的色谱软件在出现溶剂泄漏或进样错误时，应自动关闭泵、柱温箱和检测器的灯。在序列中要包括系统适应性测试。常规测试中，

系统适应性测试可以帮助评估分析系统的性能以及核实分析结果。



可以控制多台仪器。外加软件可以用于许多其它任务。提供很好的数据存贮和归档。



实验台需要较大空间摆放打印机或绘图仪等外设。

局域网

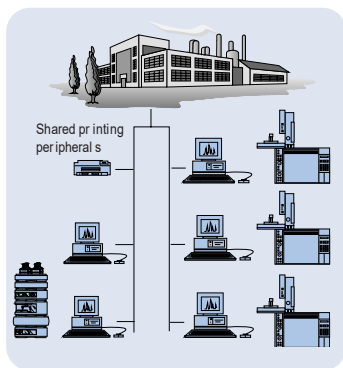


图 78

食品分析实验室通常需要从不同厂家购买多种分析仪器。虽然前面所介绍的积分仪和计算机系统可以在实验室各个分析仪器所在地采集和处理数据，但对于不同分析技术，要生成一个报告，所有的数据必须集中采集—例如通过网络。局域网在共享数据方面有几个优势。(见图 78)。共享打印节约了实验室空间和设备花费，通过服务器集中管理数据文件，可以保证数据的安全性并加速数据的备份。标准的网络软件和硬件不能处理来自不同分析厂商仪器所采集的数据。所以分析软件一定要具有把数据文件转换成ANDI格式(*.cdf)的功能。



集不同厂商的多种仪器和技术为一体。节省实验室空间和计算机资源。具有象 e-mail 一样的网络功能。



数据处理可能与专用分析软件不匹配。



网络数据处理系统

安捷伦化学工作站远程控制及数据存贮模块把单独的数据结合到客户端 / 服务器网络信息系统。每个化学工作站变成一个客户端。网络上的计算机可以在海外非常方便安全地控制和操作实验室的仪器。每个分析过程在分析的同时受到检测, 确保了分析结果的质量。如果对操作性能存在质疑, 可以使用远程控制在任何地点采取相应的措施。实验数据自动存贮在非常安全的中心服务器系统。

小结

实验室中什么样的数据处理系统最有效、最经济依赖于几个因素:

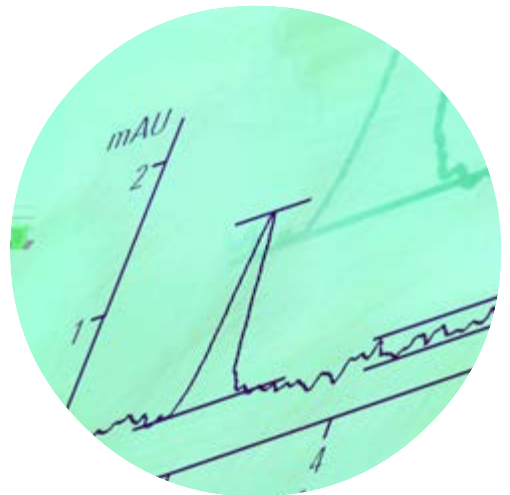
- 实验室大小
- 在组织结构中实验室的角色。
- 工业测试, 公共安全测试等因素。
- 样品量的要求。
- 样品的研究范围

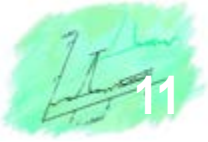
如果实验室中只有几台仪器并且样品量不大, 虽然一台计算机非常适合对多台 HPLC 进行自动操作, 但通常情况下积分仪足够。客户端 / 服务器网络数据系统可以帮助把不同厂家的仪器和技术采集的数据文件进行合并, 并且可以认证整个过程。



第 11 章

决定 HPLC 性能的因素





食品分析对HPLC仪器提出很高要求，特别是对仪器的操作性能、稳定性可靠性等方面。使用现代的评估软件可以确定一台HPLC是否适用于分析。为了证实分析过程中所做的假设或对错误数据加以注意，所有影响测试结果的因素应在分析结果公布之前就确定。

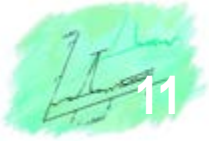
本章将着重介绍严重影响检测限(LOD)和定量限(LQD)与仪器相关的参数。我们还要讨论HPLC系统提供的准确度、精度、和定量信息。一些厂商在技术备忘录43中阐述了特定仪器的操作性能。这些备忘录详细说明了单个模块或整个HPLC系统的性能测试过程及测试结果。

检测限(LOD)和定量限(LQD)

HPLC 检测限就是检测器对感兴趣物质的响应。响应因子主要决定于检测技术的选择。然而，不管检测器质量的好坏，LOD和LQD仍是峰高的函数。如果检测物在整个流路内发生扩散，则它的峰高会降低。所以，检测器前流路中所有的备件都要设计成尽量减少死体积，以降低扩散，增加响应值。

要使用口径窄，长度短的毛细管连接进样器、色谱柱和检测器，这样可以最大限度的降低死体积。同时，进样体积尽量小，可以提高柱子的分离效率，增加峰高。另外，色谱柱体积越小，峰的洗脱体积越小。其它影响峰扩展的因素包括泵的操作性能，脱气效率，容量因子(K')以及色谱柱填料的粒度。任何提高都可以通过计算洗脱物的信噪比(S/N)来衡量。事实上，检测器的噪音应该经常通过这种方法进行检测以确保操作性能稳定。整个进样系统的死体积可以通过下述方式测量：不连接色谱柱，在一定流速下，进一针追踪流动相添加剂，记录这种添加剂到达检测器所用时间。流通池体积应尽量小，而它的光程应尽量长，这样根据 Beer 定律，可以获得最大响应。

最大的分析物响应不不一定确保好的分析结果，因为来自检测器的噪音水平会抵消样品的响应。尤其是泵的操作性能及某些溶剂会增加检测器的噪音水平，为了避免气泡，脱气是非常必要的。



因为气泡会引起噪音或尖峰，溶解在流动相中的氧气会造成荧光猝灭。

洗脱体积过大或保留时间过长会导致容量因子(K')值很高。容量因子值过高会伴随着峰宽增加，峰高值降低，即峰的保留时间越长，其信噪比越小。使用不同色谱柱，不同流动相和不同流速的目的就是为提高信噪比。色谱柱填料会直接影响峰扩展，例如颗粒小的填料可以降低峰扩展。

准确度和精密度

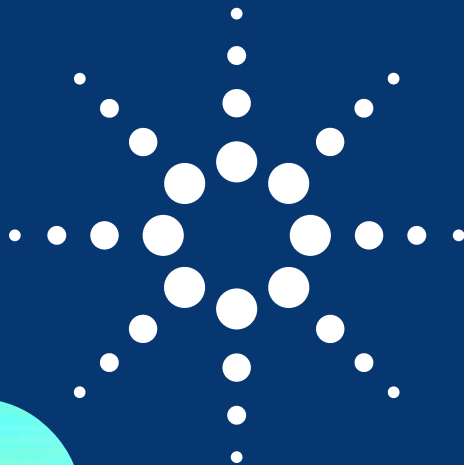
准确度是测试结果和真实值之间符合的程度。分析方法、所使用的萃取过程、色谱柱的选择以及检测器的选择都会影响测试结果的准确度。在采用任何 HPLC 方法作为常规分析方法之前，此方法与已建立的参比方法之间的符合程度应该确定，或运行控制样品和已知浓度的加料样品。实际上准确度不可能到达100%。这种不匹配可以通过已知浓度的标样建立校正曲线来纠正，基于这种校正结果来计算未知样品浓度。在食品分析中，使用外标法或内标法进行定量分析可以确保分析结果的准确度。一个方法的精密度是对同一样品多次测定结果之间的一致程度。精密度可以通过测量系列标样的保留时间、峰高或峰面积的相对标准偏差来获得。精密度有三个水平：重复性，中间精密度和再现性。重复性是在一个实验室由一个操作人员使用一台仪器在相对短的时间间隔内进行分析得到的结果。

中间精密度是一个测试过程的长期变动，是一个方法在同一个实验室在不同日期完成的测试。再现性是使用同一方法在不同实验室进行实验得到的精密度。任何用于食品分析的方法必须测量方法的重复性和再现性。

一个方法的精度受HPLC仪器操作性能的影响非常大。流速、梯度组成以及进样体积的重复性会影响精密度，同样会影响检测器的稳定性，色谱柱寿命和柱温箱温度的稳定性。仪器应该按照厂商推荐的方法进行定期检查以确保可靠性，高性能以及好的分析结果。

定性信息

HPLC的分析物可以基于保留时间、紫外谱图或质谱图进行定性。然而化合物首先是依据校正标样与样品保留时间的符合程度进行定性。但由于样品中含有未知杂质而引起共流出，这样会得出错误的分析结果，尤其是肉、蔬菜或饮料这类食品基体。在这种情况下，样品经常通过紫外谱图进行定性。二极管阵列检测器可以进行在线采集，同时大量软件包可以进行自动计算，例如多核芳烃(PNAs)的分析，杀虫剂的分析⁴¹。



安捷伦科技公司对本材料可能存在的错误或与装置、性能及材料使用有关内容而带来的意外伤害和问题不负任何责任。

本资料中的信息，如有改变，恕不另行通知。

安捷伦科技公司版权所有[®]，2001

2001 年 11 月 28 日中国印刷

出版号：5988-3294CHCN

www.agilent.com/chem



Agilent Technologies