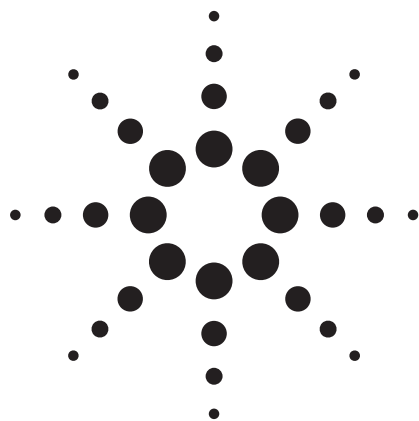




快速筛查和分析非酒精饮料中的成分 应用

食品

作者

Michael Woodman
Agilent Technologies, Inc.
2850 Centerville Road
Wilmington, DE 19808-1610
USA

摘要

软饮料、果汁和预先制好的茶饮料都是很流行的饮料，它们都有很严格的配方，以使其具有独特的香味，并确保产品的稳定性。许多最终产品的生产厂具有监测重要成分的方法，如测定糖分、香味、着色剂、防腐剂等，但可能会发现在需求量大的季节，分析速度无法跟上生产需求。这里，我们选择一种添加剂和甜味剂的经典分析方法，把它转换为能够提高样品通量和分离度的新方法，同时还能降低溶剂消耗量。

引言

质量控制 (QC) 实验室总是面临这样的挑战，要以较少的仪器和人员满足越来越高的样品负荷，但在分析处理过程中，数据质量不能受到影响。尽管一些实验室已经成功地采用了更为自动化的样品制备和数据处

理方式，他们仍在寻找机会进一步提高色谱通量。在 5 或 10 μm 粒径色谱柱上的方法，如改用装填有小粒径填料的直径较小的色谱柱，就可以实现方法的更新。从事添加剂、防腐剂、香精和甜味剂等小分子分析的饮料 QC 实验室就面临极好的机会。在方法开发和研究实验室，与质谱仪离子源的兼容性也是减小色谱柱的大小、支持低流速运行的一大驱动力。

在缩短分析时间的同时，为了使得分离度不受影响，我们可以同时减小色谱柱的长度和填料粒径。如果考虑梯度延迟体积和实际的柱外扩散效应，对 HPLC 系统进行合理的优化，很容易获得平衡的效果。例如，一根 5 μm 粒径、250 mm 柱长的色谱柱可以被 3 μm 粒径、150 mm 柱长的色谱柱所取代。换言之，如果长度与粒径的比例相等，则认为这两根色谱柱具备相同的分离能力。溶剂消耗量成比例减少，并且，如果可以成功注入相等质量的被分析物，由于其以相同的效率在一根较小的色谱柱中运行，色谱峰的稀释作用降低了，因而灵敏度也将得到提高。

已经得到证实，与一般的 LC/UV (UV/Vis 光学检测) 方法相比，LC/MS (液相色谱/质谱) 离子源在较低的流速下灵敏度更高，电喷雾离子化方式尤其如此。



Agilent Technologies

在 MS 检测模式下，通过减小内径来降低柱容量是非常有利的。同时，将根据色谱柱的直径和横断面的大小成比例地降低流速。不同色谱柱直径与流速的变化关系见式 1。

$$\text{流速}_{\text{柱}1} \times \left[\frac{\text{直径}_{\text{柱}2}}{\text{直径}_{\text{柱}1}} \right]^2 = \text{流速}_{\text{柱}2} \quad (\text{式} 1)$$

柱长和直径减小的联合效应表现在降低溶剂消耗量，并且如果假设可以将相同质量的被分析物注入较小的色谱柱，色谱峰响应将有相应比例的提高。不过，我们一般根据色谱柱的大小来按比例调整进样量。进样量的调整比例可以通过原色谱柱的进样量乘以两根色谱柱的空体积比值计算得到，见式 2。

$$\text{进样量}_{\text{柱}1} \times \left[\frac{\text{空体积}_{\text{柱}2}}{\text{空体积}_{\text{柱}1}} \right] = \text{进样量}_{\text{柱}2} \quad (\text{式} 2)$$

对于等度洗脱，在上述条件下一般可以得到很好的方法转换结果，总体分离度没有或几乎没有变化。还有其它一些参数也应考虑。第一，是柱效与流速的关系，或者更确切地说，柱效与 van Deemter [1] 和他人所提出的线速度之间的关系；第二，是通常被忽略的柱外扩散效应对实际柱效或经验柱效的影响。

Van Deemter 发现并给出了柱效与一系列参数之间关系的数学表达式，但是这里我们最感兴趣的，是对于任何给定的粒径的 HPLC 填充柱中，存在最佳的线速度，并且最佳线速度随着粒径的减小而提高。直观起见，常以 van Deemter 图来表示板高与线速度之间的关系。一般说来，粒径减小导致柱效升高，线速度升高，最高柱效的范围扩大，可以在更宽的流速范围内获得好的分离效能。

第二点重要的考虑是通常被忽略的柱外扩散效应对实际柱效或经验柱效的影响。随着柱容量的降低，色谱峰洗脱容量也成比例地降低。如果同时还应用了较小粒径的填料，预期的峰容量会进一步降低。用户应注意减小柱外体积，即在实际使用时，减少连接接头的用量以及进样阀和检测器流通池的体积。

对于梯度洗脱分离，从分析的开始阶段直到目标被分析洗脱，流动相的组成不断增加，成功地将方法转换到较小的色谱柱上时，要求保持梯度斜率不变。最为有用的是以相对于柱容量的变化量 (%) 表示梯度斜率。这样，能够准确地把方法转换中产生的柱容量变化考虑进新的梯度条件中，而无需考虑流速或色谱柱的直径和长度。我们用式 3 来表示梯度：

$$\text{梯度斜率} = \left[\frac{(\text{结束} \% - \text{开始} \%)}{\# \text{ 柱容量}} \right] \quad (\text{式} 3)$$

如梯度斜率大，则梯度变化大且分离度较小，而较小的梯度斜率可得到较高的分离度，但在同时，溶剂消耗量增加，灵敏度降低。在分析时间和运行压力允许的范围内，可以通过延长梯度时间或加大流速，使得梯度斜率降低，也可以同时改变梯度时间和流速。

分离度随梯度斜率的减小而提高，这是因为有效容量因子 k^* 增大了。和等度分离类似，容量因子称为 k' ，该值增大，将直接导致分离度的提高。 k 值约在 5~10 之间时，这一效应非常明显，而超出这一范围后的影响极为有限。以下的例子中，我们将看到与上述讨论的计算相关的结果。

实验条件

系统

Agilent 1200 系列快速分离 LC, 包括:

G1379B 微脱气机

G1312B 二元泵 SL

带温控的 G1367C HiP 自动进样器 SL

G1316B 柱温箱 SL

G1315C UV/VIS 二极管阵列检测器 SL, 流通池条件在各色谱图中列出
32 位 ChemStation, B.02.01 版

色谱柱

Agilent ZORBAX SB-C18, 4.6 mm × 250 mm, 5 μm

Agilent ZORBAX SB-C18, 3.0 mm × 50 mm, 1.8 μm

流动相条件

有机相: 乙腈或含有 1% 甲酸的乙腈

水相: 20 mM 磷酸的 Milli-Q 水溶液, 以氨水调节 pH 至 3.65,
或 0.1% 甲酸的 Milli-Q 水溶液

梯度条件

梯度斜率: 2.8%/柱容量。流速和时间见各色谱图。

样品

1. 糖精钠、咖啡因、阿斯巴甜、香草醛、苯甲酸、山梨酸、苯甲醛的标准混合物, 以甲醇-水 (1:1) 溶解并制成 50 μg/mL 的溶液
2. 各种软饮料, 需要时除去碳酸 applicable

结果

图 1 为在柱温 30℃ 的 4.6 mm × 250 mm、5 μm ZORBAX SB-C18 色谱柱上使用磷酸盐缓冲液运行的结果。在该 pH 条件下, 以乙腈为有机改性剂, 苯甲酸盐和山梨酸盐在 SB-C18 柱上获得了足够的分离。而以甲酸为改性剂, 在 pH 2.5 的条件下, 这两种化合物的分离度较差, 尽管其他化合物的选择性和峰形都相对较好。另外, 在较低的 pH 条件下, 观察到苯甲醛发生了柱上降解, 可能降解为苯甲酸盐。在其他实验中也观测到这一情况 (数据未在此显示), 当柱温升高时尤其明显。用氨水调节 pH, 形成甲酸铵缓冲液, 达到与磷酸相同的 pH 值, 很可能同时解决以上问题, 并且适合于 MS 检测。

然后, 根据计算, 按比例调整流速和时间, 把方法转换到 3.0 mm × 100 mm 3.5 μm 和 1.8 μm 色谱柱上 (数据未在此显示)。重新计算了 3.0 mm × 50 mm 1.8 μm 填料色谱柱上的梯度, 结果见图 2。通过进一步的梯度计算, 提高了运行速度, 而分离度并没有损失 (见图 3 和图 4)。

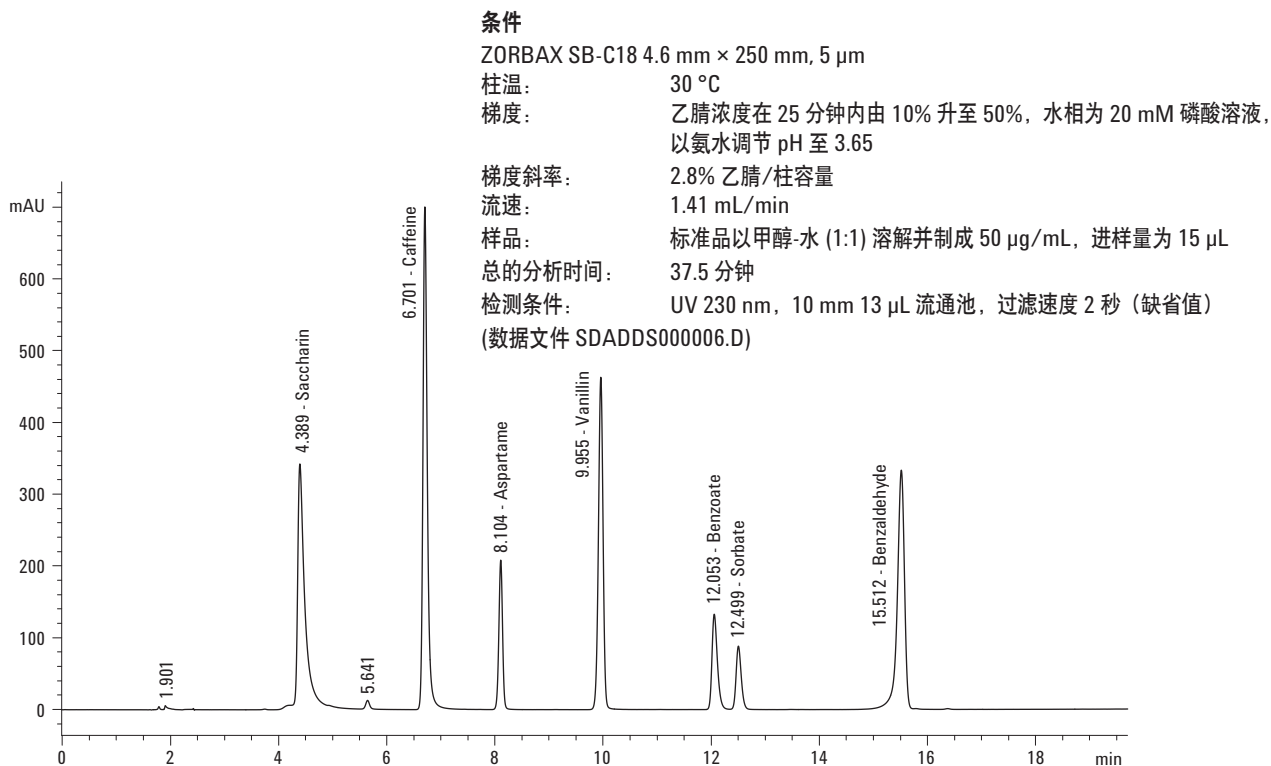
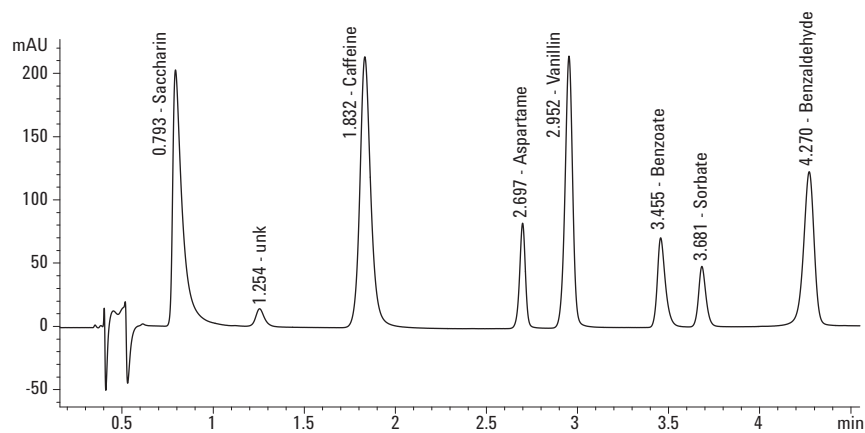


图 1. 软饮料添加剂在 4.6 mm × 250 mm 5 μm ZORBAX SB-C18 色谱柱上的梯度分离



条件

ZORBAX SB-C18 3.0 mm × 50 mm, 1.8 μm

柱温: 45 °C

梯度: 乙腈浓度在5分钟内由 10% 升至 50%，水相为 20 mM 磷酸溶液，以氨水调节 pH 至 3.65

梯度斜率: 2.8% 乙腈/柱容量

流速: 0.6 mL/min

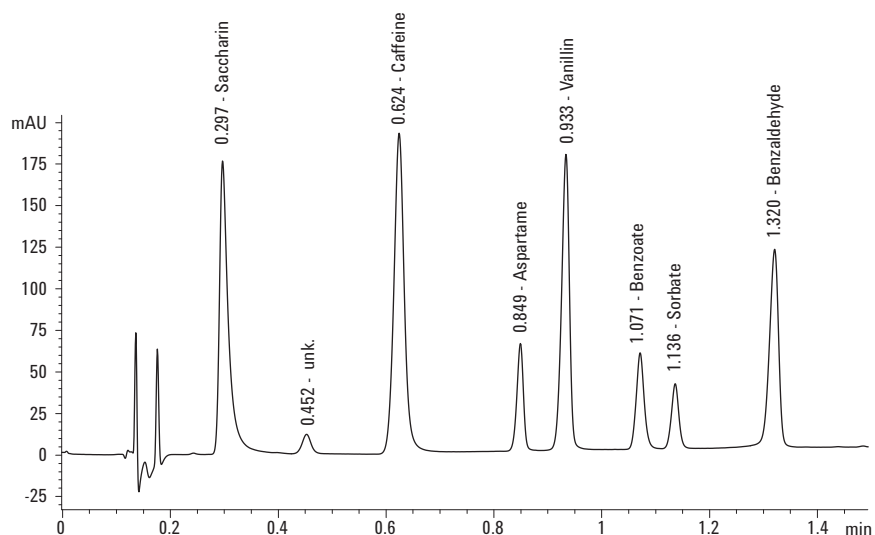
样品: 标准品以甲醇-水 (1:1) 溶解并制成 50 μg/mL，进样量为 2.5 μL

总的分析时间: 9 分钟

检测条件: UV 210 nm, 6 mm 5 μL 流通池, 带 0.12 mm 内径内接管的热交换器, 过滤速度 2 秒 (缺省值)

(数据文件 SDADDS_3MM21004.D)

图 2. 软饮料添加剂在 3.0 mm × 50 mm 1.8 μm ZORBAX SB-C18 色谱柱上的梯度分离



条件

ZORBAX SB-C18, 3.0 mm × 50 mm, 1.8 μm

柱温: 45 °C

梯度: 乙腈浓度在 1.5 分钟内由 10% 升至 50%，水相为 20 mM 磷酸溶液，以氨水调节 pH 至 3.65

梯度斜率: 2.8% 乙腈/柱容量

流速: 2.0 mL/min

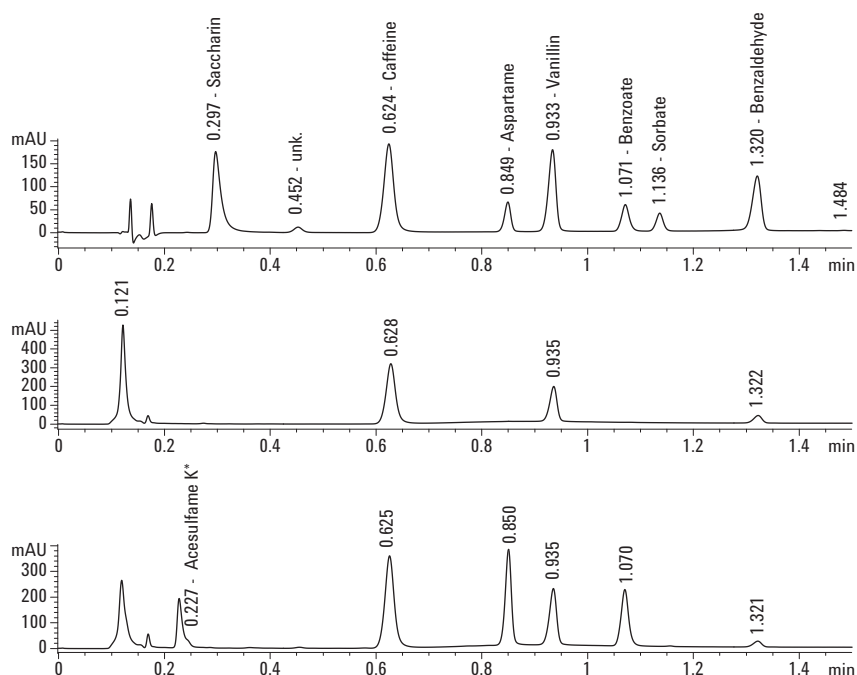
样品: 标准品以甲醇-水 (1:1) 溶解并制成 50 μg/mL，进样量为 2.5 μL

总的分析时间: 3 分钟

检测条件: UV 210 nm, 6 mm 5 μL 流通池, 带 0.12 mm 内径内接管的热交换器, 过滤速度 2 秒 (缺省值)

(数据文件 SDADDS_3MM31029.D)

图 3. 软饮料添加剂在 3.0 mm × 50 mm 1.8 μm ZORBAX SB-C18 色谱柱上的高速梯度分离



条件

色谱条件见图 3

*参照其他样品的相同分析条件和产品标签声明对安赛蜜进行试验性的鉴别

样品: 上图为标准混合液

中图为黑莓香草可乐, 20-oz 聚合物瓶装, 除去碳酸, 进样量 2.5 μL

下图为健怡黑莓香草可乐, 20-oz 聚合物瓶装, 除去碳酸, 进样量 2.5 μL

(数据文件 SDADDS_3MM31029.D, SDADDS_3MM31043.D, SDADDS_3MM31044.D)

图 4. 软饮料添加剂在 3.0 mm × 50 mm 1.8 μm ZORBAX SB-C18 色谱柱上的高速梯度分离

图 3 和图 4 的色谱图中, 梯度斜率为 2.8%, 加上 3.0 mm × 50 mm 1.8 μm 色谱柱增加的线速度, 分离度与在 4.6 mm × 250 mm 色谱柱上运行时相比有很大的提高。按照一般的计算, 1.8 μm 色谱柱的绝对塔板数为 12000, 低于 250 mm 5 μm 色谱柱的 24000, 分离度的增加很可能与运行温度的提高有关, 它降低了溶剂的粘度, 以及非专属性的色谱柱与被分析物的相互作用, 另外, 也与 1.8 μm 填料所提高的线速度有关。总的分析时间仅需 3 分钟, 这对于高通量筛选和大量样品的定量分析是非常重要的。

结论

对梯度斜率进行认真的转换计算, 并结合亚 2 μm 填料的最佳线速度, 有助于用户很好地应用小规格色谱柱, 在保持分离度不受影响的同时能够缩短分析时间。对柱外体积的优化有助于避免影响柱效的分离度损失, 确保获得最大的分离度, 并缩短分析时间。我们已经证明这种方法转换可以用于分析典型饮料中复杂的添加剂混合物。如果用户对本应用报告或其他方法转换有任何问题, 欢迎与我们联系。

参考文献

1. J. J. van Deemter, F. J. Zuiderweg, A. Klinkenberg, *A. Chemical Engineering Science* 1956, **5**, 271–289
2. The Influence of Sub-Two Micron Particles on HPLC Performance, Agilent Technologies, application note 5989-9251EN, May 2003

更多信息

有关产品和服务的更多信息，请访问我们的网站
www.agilent.com/chem/cn。

安捷伦公司对本材料中可能有的错误或有关装备、性能或使用这一材料而带来的偶然或间接伤害不负任何责任。

本材料中的信息、说明和指标，如有变更，恕不另行通知。

© 安捷伦科技公司版权所有，2006

中国印刷
2006 年 8 月 3 日
5989-5178CHCN



Agilent Technologies