



使用 Agilent Poroshell 120 EC-C18 表面多孔填料色谱柱快速、低压分析食品和饮料添加剂

应用报告

食品和饮料

作者

Anne E. Mack, William J. Long
安捷伦科技公司
2850 Centerville Road
Wilmington, DE 19808
美国

摘要

本文采用 Agilent Poroshell 120 EC-C18, 3.0 mm × 100 mm, 2.7 μm 色谱柱, 以醋酸铵/乙腈梯度洗脱, 在不到 3 min 的时间内对 11 种非营养型食品和饮料添加剂进行了分析。分析的最大压力低于 400 bar, 使得该方法适用于各种标准高效液相色谱仪。Agilent Poroshell 120 EC-C18 色谱柱与 Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18, 3.0 mm × 100 mm, 1.8 μm 及 4.6 mm × 250 mm, 5 μm 色谱柱具有相似的选择性和柱效。虽然 1.8 μm 填料的 Agilent ZORBAX Eclipse Plus 色谱柱可在相同的时间达到与 Agilent Poroshell 120 色谱柱同样理想的分离效果, 但最大压力超过 400 bar, 使其必须采用高压 HPLC 仪。反之, 5 μm 填料的 Agilent ZORBAX Eclipse Plus 色谱柱可在低于 400 bar 的压力下进行分析, 但却需要更多的时间才能完成相同的分离。本应用报告演示了使用同一台高效液相色谱仪, 将采用 Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18 色谱柱的旧方法转移到新型 Agilent Poroshell 120 EC-C18 色谱柱上, 与旧方法相比, 柱效和选择性相似, 但可以节省大量时间。



Agilent Technologies

前言

常规耐压 400 bar 的高效液相色谱系统在许多实验室中都可看到。随着超高液相色谱的引入,人们越来越倾向于使用亚 2 μm 填料颗粒。与传统的 5 μm 颗粒色谱柱相比,填充亚 2 μm 填料颗粒的高效液相色谱柱具有更高的分离度并能减少分析时间,但同时会增大系统反压。对于那些希望将现有的方法转移到亚 2 μm 颗粒色谱柱,但又无力购买高压液相色谱仪的分析人员而言,填充表面多孔颗粒的色谱柱也许能够解决这个问题。Agilent Poroshell 120 色谱柱与填充 1.8 μm 颗粒的色谱柱具有相似的分离度和分析速度,但不产生高压。

Agilent Poroshell 120 填料色谱柱与亚 2 μm 全多孔填料颗粒色谱柱具有相似的高柱效,这是由于其传质距离短和粒径分布窄的原因。较大的 2.7 μm 填料 Agilent Poroshell 120 色谱柱的背压很低,大概为亚 2 μm 全多孔颗粒填充色谱柱的 40%~60%。这样就可以在不超过 HPLC 最大压力的情况下提高流动相流速。具有 2 μm 孔径筛板的 Agilent Poroshell 120 色谱柱比 1.8 μm 填料色谱柱对脏样品的容忍度最高,可更方便的将使用传统 5 μm 填料色谱柱的方法实现完美转移[1-3]。

本应用报告演示了在保持系统反压低于 400 bar 的情况下,将采用填充 5 μm 颗粒的较长色谱柱建立的方法转移为使用表面多孔填料颗粒填充的较短色谱柱的类似 UHPLC 的方法。这可以减少样品和流动相消耗,显著节约分析时间,并与亚 2 μm 填料色谱柱具有相似的选择性和柱效,可用任意高效液相色谱系统进行分析。

使用一组包含 11 种非营养型食品和饮料添加剂证实了该方法的转移的成功。这些化合物包括防腐剂、人工甜味剂、一种能量补充剂和一种调味剂。适量使用这些化合物对身体无害,但过量和长期使用会导致增敏和过敏反应[4]。因此,对这些添加剂进行检测和定量分析至关重要。

实验部分

本实验采用 Agilent 1200 Rapid Resolution LC (RRLC)系统:

- G1312B SL 型二元泵,流动相 A: 20 mM 醋酸铵 (pH 4.80); B: 乙腈。梯度洗脱程序: 从 t_0 时的 14% B 逐渐升到 52% B,梯度时间的设置依据色谱柱规格和流速而定,见表 1
- G1367C SL 型自动液相进样器(ALS),可为 4.6 mm $\times$ 250 mm 和 3.0 mm $\times$ 100 mm 色谱柱分别进样 11.8 μL 和 2.0 μL
- G1316B SL 型柱温箱(TCC),柱温设为 30 $^{\circ}\text{C}$
- G1315C SL 型二极管阵列检测器(DAD),检测波长设置为 230, 4 nm; 参比波长设置为 360, 100 nm, 配置 G1315-60024 微量流通池(光程 3 mm, 体积 2 μL)
- 采用 B.04.01 (491)版化学工作站控制高效液相色谱操作并处理数据

表 1. 不同色谱柱的高效液相色谱参数

色谱柱	流速 (mL/min)	梯度时间 (min)	停止时间 (min)	后运行时间 (min)
Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18 4.6 mm $\times$ 250 mm, 5.0 μm	1.000	12.00	13.10	7.00
Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18 3.0 mm $\times$ 100 mm, 3.5 μm	0.638	3.00	3.50	2.00
Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18 3.0 mm $\times$ 100 mm, 1.8 μm	0.851	2.10	2.60	1.80
Agilent Poroshell 120 EC-C18 3.0 mm $\times$ 100 mm, 2.7 μm	0.851	2.10	2.60	1.80

本实验采用四种类型的安捷伦色谱柱：

- Agilent Poroshell 120 EC-C18, 3.0 mm × 100 mm, 2.7 μm (部件号 695975-302)
- Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18, 3.0 mm × 100 mm, 1.8 μm (部件号 959964-302)
- Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18, 3.0 mm × 100 mm, 3.5 μm (部件号 959961-302)
- Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18, 4.6 mm × 250 mm, 5 μm (部件号 959990-902)

图 1 列出了各目标化合物及其结构、pKa 值和作为添加剂的作用。将各化合物分别配制成 1 mg/mL 的水溶液。再取等量的上述溶液混匀制成混合样品。这些化合物以及乙腈、醋酸铵均购自 Sigma Aldrich (Bellefonte, PA), 水采用 18 M- Milli-Q 超纯水(Bedford, MA)。

结果与讨论

图 2 显示采用传统的 Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18, 4.6 mm × 250 mm, 5 μm 色谱柱在 13 min 略多的时间里实现了 11 种食品和饮料添加剂的分离。图 3 显示, 采用 Agilent ZORBAX

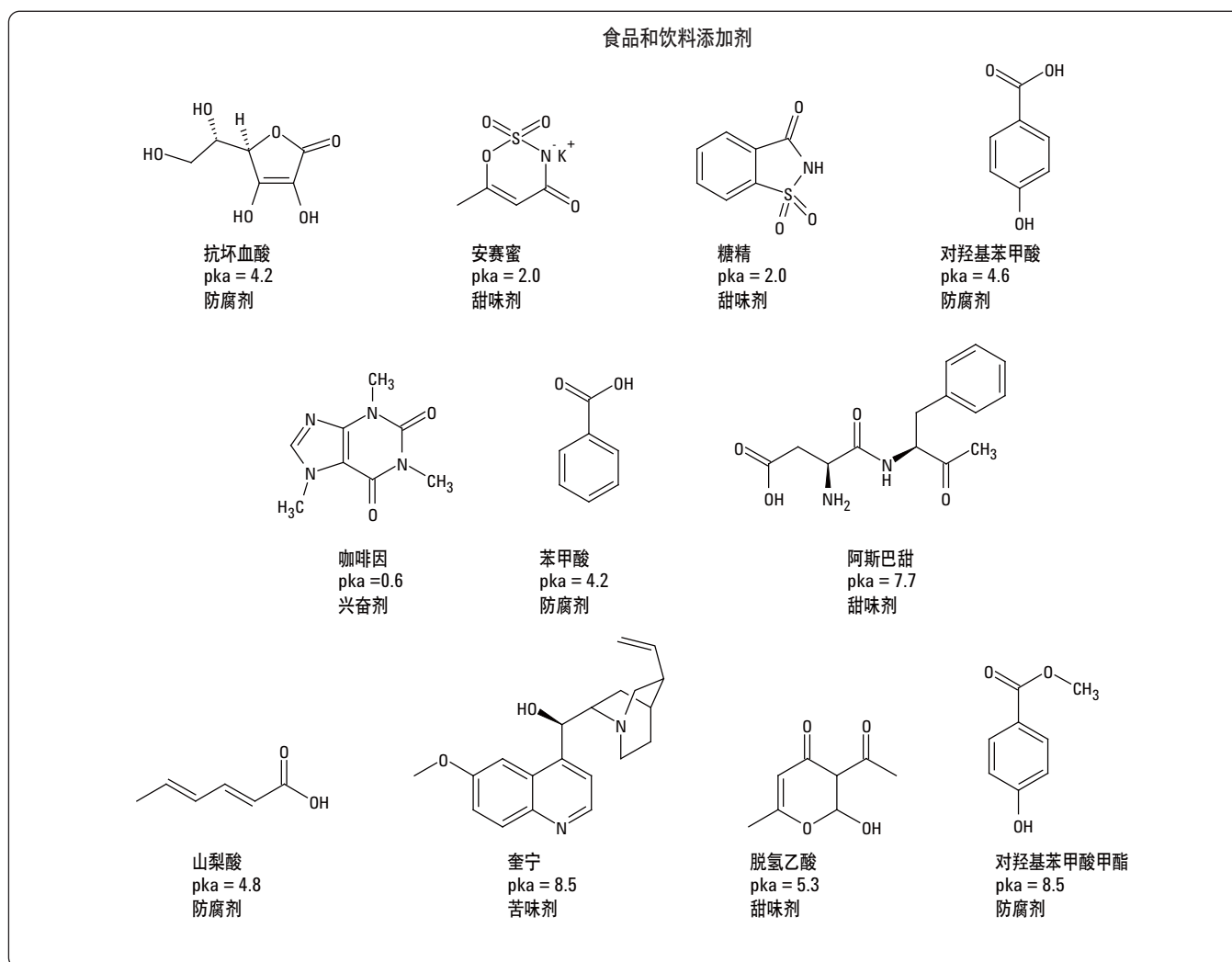


图 1. 目标化合物

Eclipse Plus C18, 3.0 mm × 100 mm, 3.5 μm 色谱柱可以达到同样的分离效果, 但将分析时间显著缩短至 3.5 min。分析流速根据较小的色谱柱内径和较小的填料粒径进行了调整。但本例中, 3.5 μm 的色谱柱无法分离如下两对色谱峰: 苯甲酸/阿斯巴甜以及脱氢乙酸/对羟基苯甲酸甲酯。图 4 显示采用 Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18, 3.0 mm × 100 mm, 1.8 μm 色谱柱进行同样的分离。调整 1.8 μm 色谱柱的流速使较小的亚 2 μm 颗粒色谱柱性能最优化。所有化合物在稍多于 2.5 min 的时间内达到分离。这一快速分析提高了实验效率, 并减少了流动相和溶剂消耗。

3.0 mm × 100 mm 色谱柱内径较小, 因此需要较小的样品量, 节省了样品。但亚 2 μm 色谱柱会产生高压 (483 bar), 因而需要高压液相色谱系统。图 5 展示了采用表面多孔填料的 Agilent Poroshell 120 EC-C18, 3.0 mm × 100 mm, 2.7 μm 色谱柱进行同样的分离, 与 1.8 μm 色谱柱一样可缩短分析时间。采用该色谱柱分离的另一优点就是反压较低 (356 bar)。超过 100 bar 的压力差异是很重要的, 因为它决定了是否需要采用高压高效液相色谱系统, 还是只用传统的高效液相色谱系统 (最高耐压 400 bar) 即可满足分析需求。

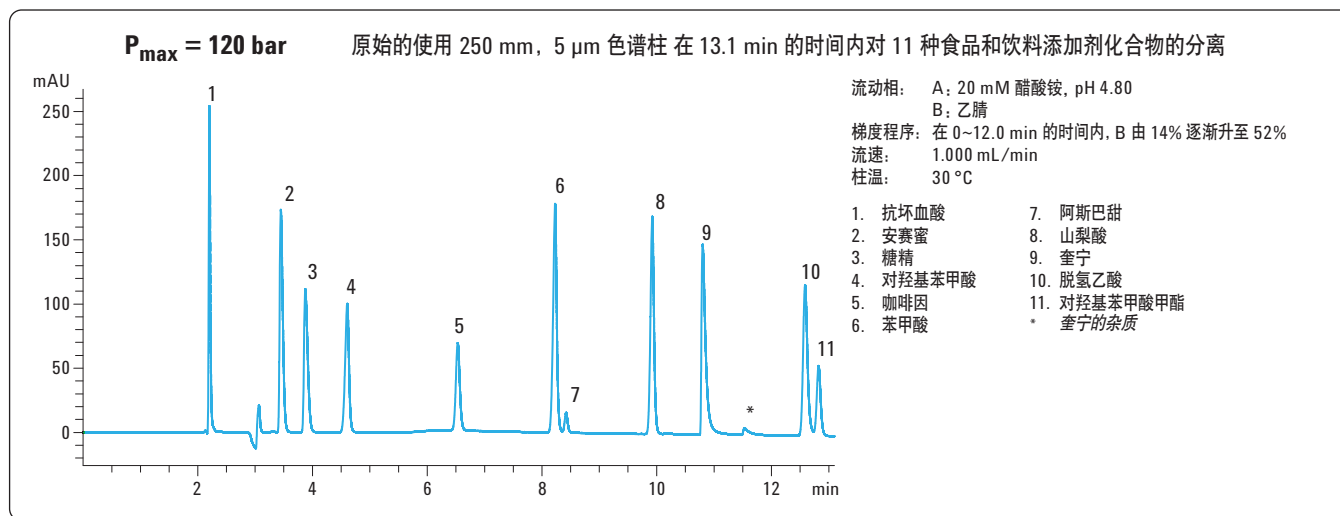


图 2. 采用 Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18, 4.6 mm × 250 mm, 5 μm 色谱柱, 以醋酸铵/乙腈对 11 种食品和饮料添加剂进行梯度洗脱分离

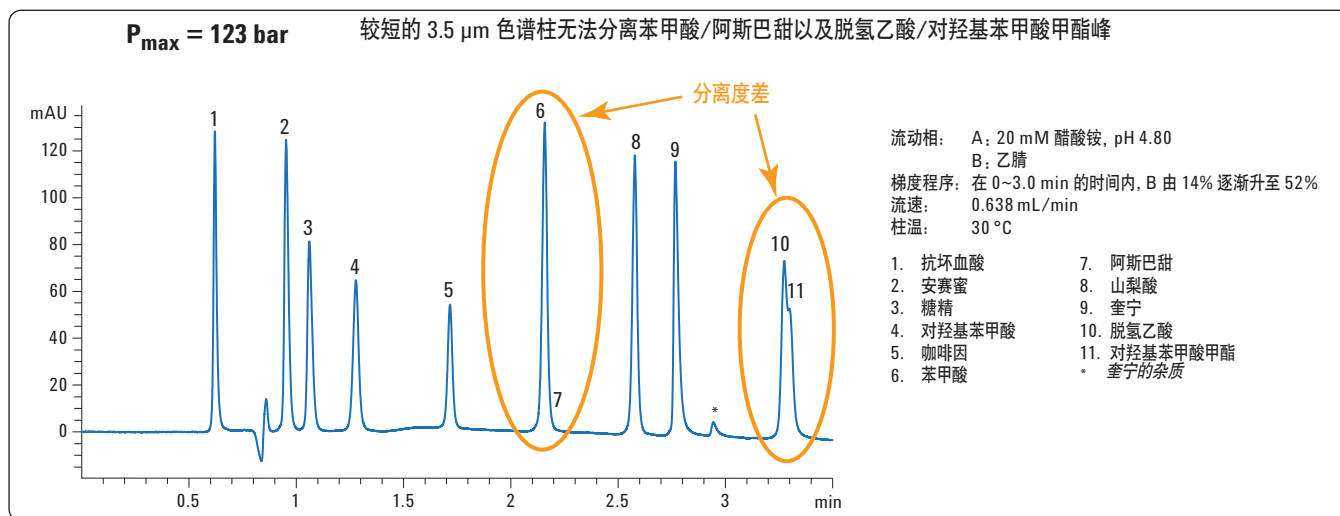


图 3. 采用 Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18, 3.0 mm × 100 mm, 3.5 μm 色谱柱, 以醋酸铵/乙腈对 11 种食品和饮料添加剂进行梯度洗脱分离

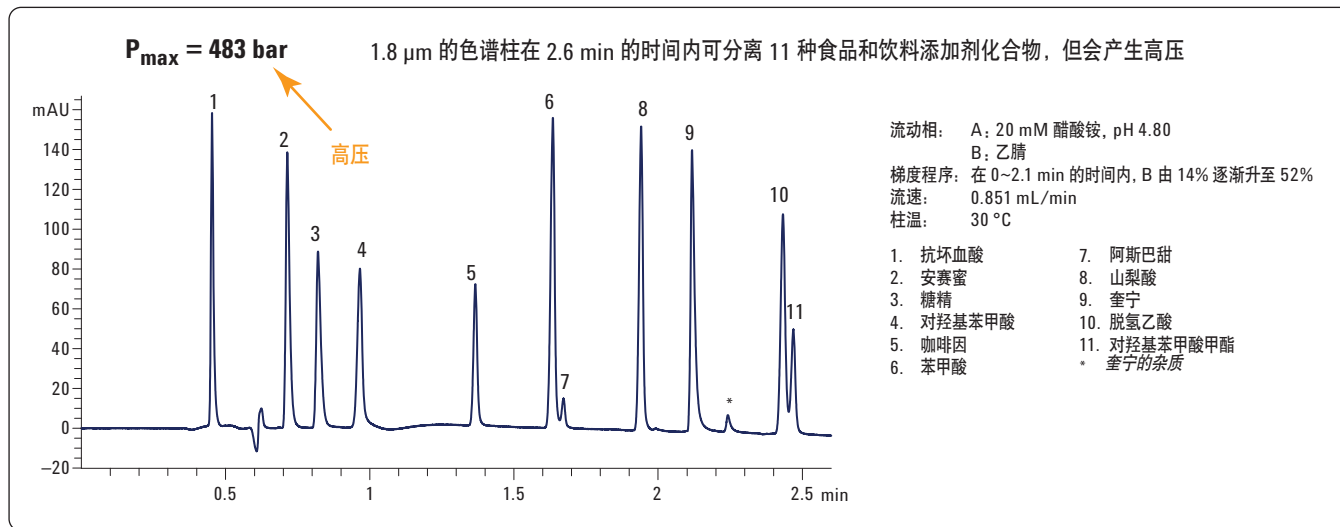


图 4. 采用 Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18, 3.0 mm × 100 mm, 1.8 μm 色谱柱, 以醋酸铵/乙腈对 11 种食品和饮料添加剂进行梯度洗脱分离

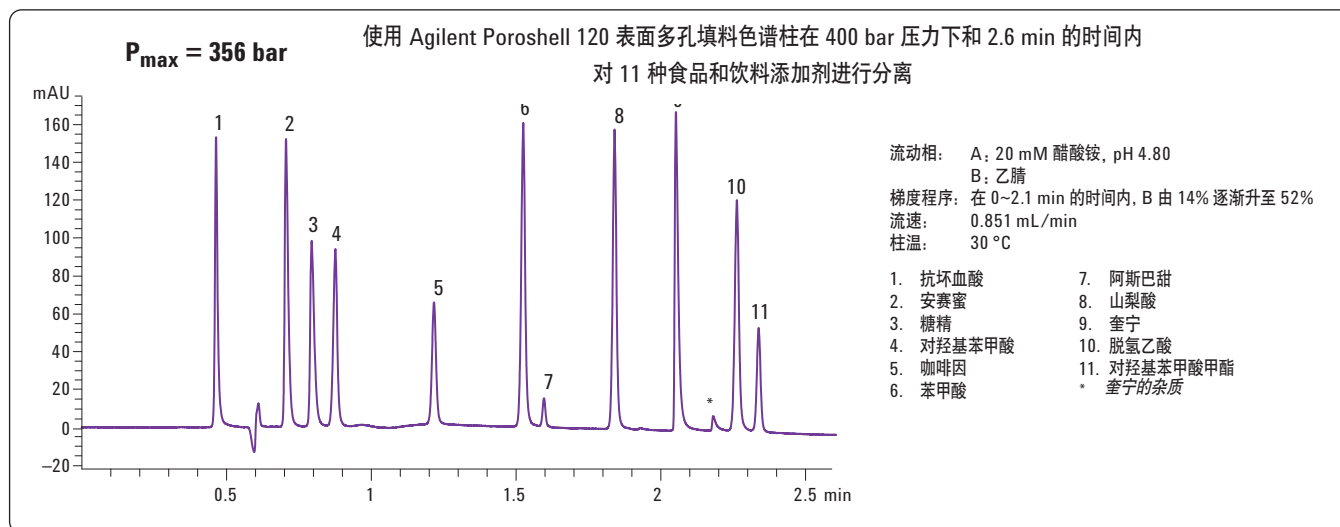


图 5. 使用 Agilent Poroshell 120 EC-C18, 3.0 mm × 100 mm, 2.7 μm 表面多孔填料色谱柱, 以醋酸铵/乙腈梯对 11 种食品和饮料添加剂进行梯度洗脱分离

图 6 为采用原始的 5 μm 填料色谱柱方法和采用新的 Agilent Poroshell 120 色谱柱方法色谱叠加对比图。分析时间由 13.1 min 缩短至 2.6 min, 后运行时间由 7 min 缩短至 1.8 min。溶剂和流动相消耗减少 80% 以上。与采用较长的 5 μm Agilent ZORBAX Eclipse Plus 色谱柱方法相比, 采用 Poroshell 120 色谱柱方法关键峰(脱氢乙酸和对羟基苯甲酸甲酯)的分度由 1.79 增至 3.01。请注意图 6 中 Agilent Poroshell 120 色谱柱的最后一个洗脱峰与 5 μm Agilent ZORBAX Eclipse Plus 色谱柱的第一个洗脱峰的保留时间基本相当。

在低于 400 bar 的压力下, 在不到 2.6 min 的时间内成功分析了四

种消费品样品(见图 7)。能量饮料含咖啡因、苯甲酸和山梨酸; 苏打水含糖精、咖啡因、苯甲酸和阿斯巴甜; 嗽口水含糖精和苯甲酸; 无糖口香糖含安赛蜜和阿斯巴甜。

如图 8 所示, 当需要满足高通量分析要求且高效液相色谱系统允许时, 可提高流速却基本不影响色谱峰质量。在低于 600 bar 压力下, Agilent Poroshell 120, 3.0 mm $\times$ 100 mm 色谱柱的流速可由 0.851 mL/min 提升至 1.489 mL/min, 进一步缩短了 40% 的运行时间。关键峰的分度损失很小, 而且对条件峰容量(n_c)影响最小[5]。结果在低于 600 bar 反压下, 仅需 1.5 min 即可实现 11 种化合物的基线分离。

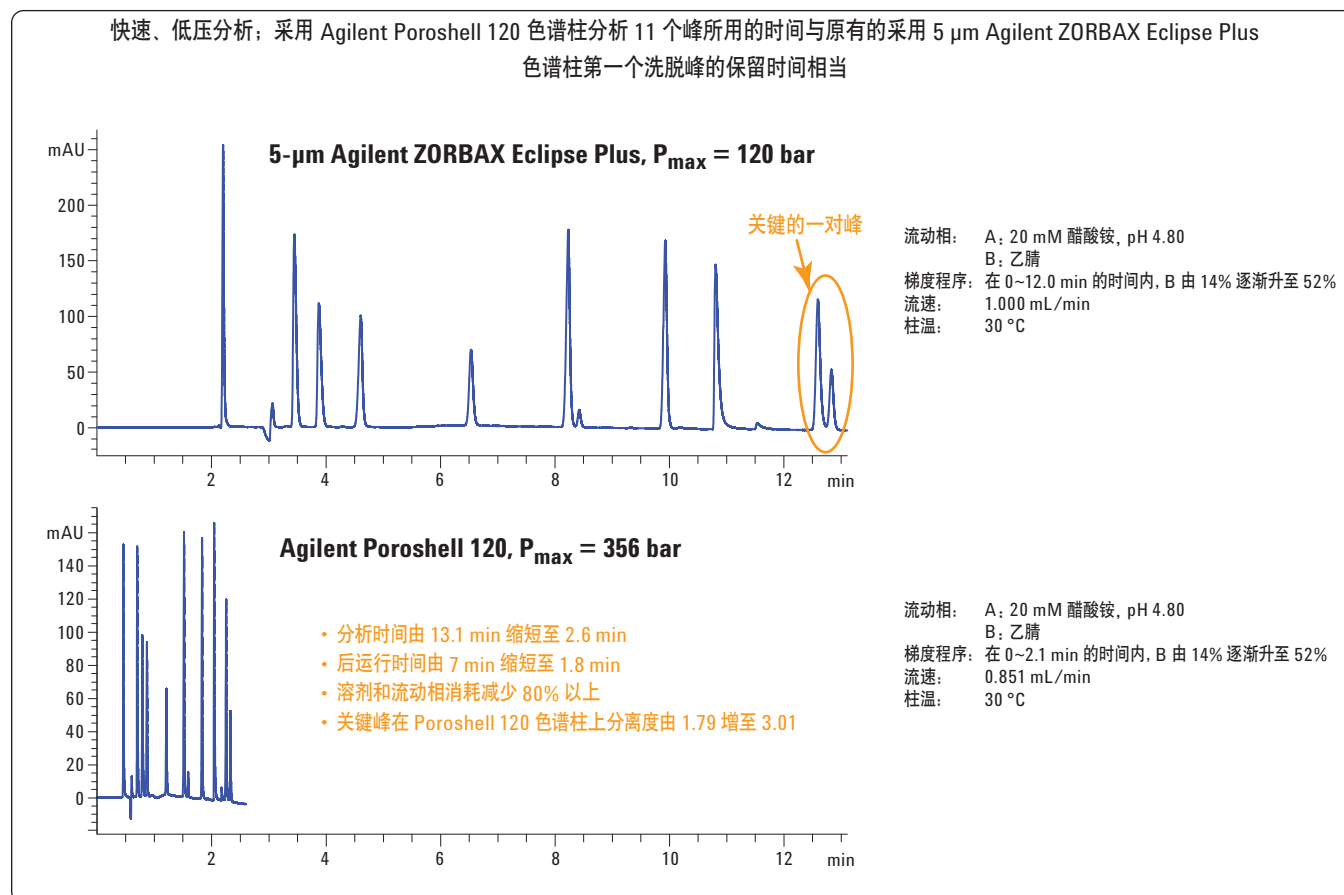


图 6. 原有的采用 Agilent Eclipse Plus 5 μm 色谱柱方法和采用新型的 Agilent Poroshell 120 色谱柱方法的叠加色谱图

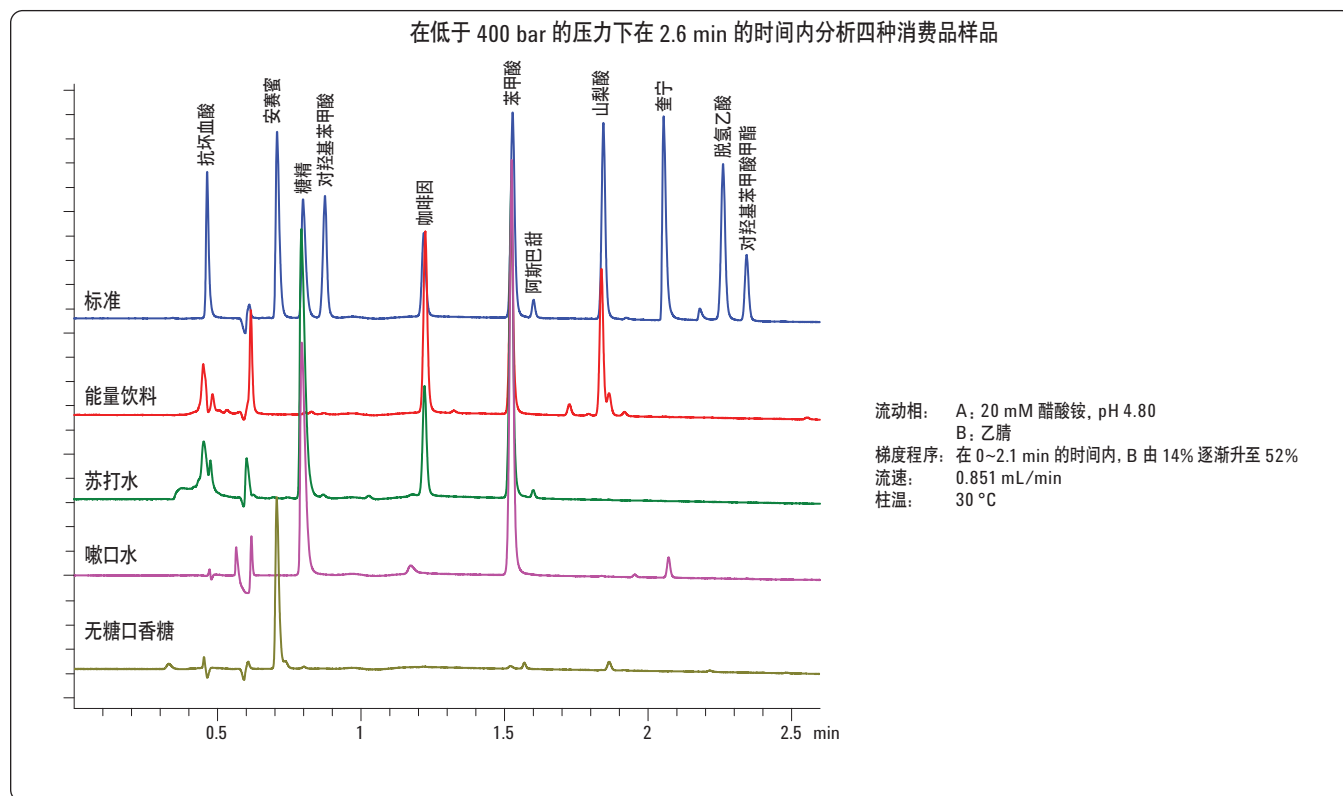


图 7. 采用 Agilent Poroshell 120 EC-C18, 3.0 mm × 100 mm, 2.7 μm 表面多孔填料色谱柱对四种消费品样品进行分析

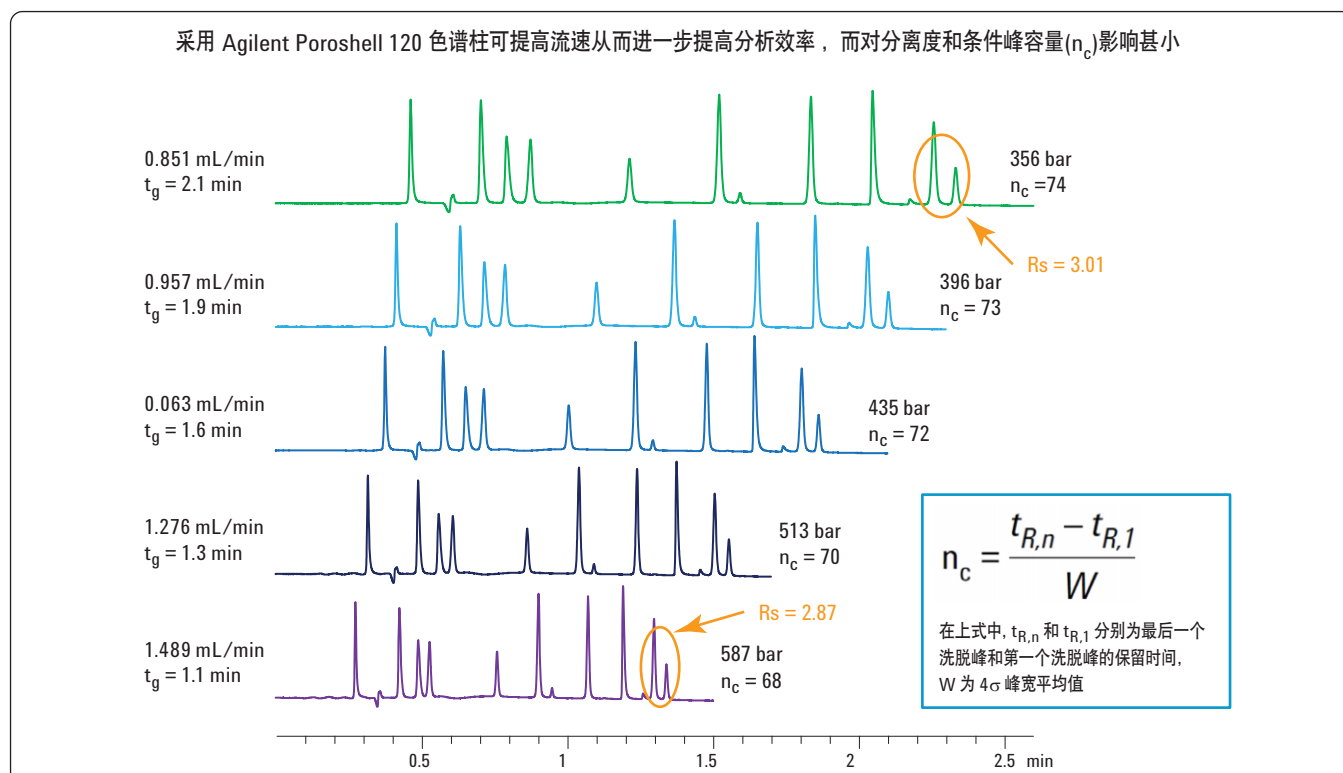


图 8. 采用 Agilent Poroshell 120 色谱柱考察提高流速对色谱峰质量影响的叠加色谱图

结论

填充表面多孔颗粒比填充常规全多孔颗粒的 HPLC 色谱柱具有更多优势。表面多孔的 2.7 μm 填料 Agilent Poroshell 120 EC-C18 色谱柱与 1.8 μm 填料 Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18 色谱柱具有相似的柱效和选择性,但不产生高压。尽管使用填充 5 μm 较大填料颗粒的较长色谱柱可获得相似的柱效且无高压,但会显著延长分析时间。由于 Poroshell 120 EC-C18 色谱柱和 Eclipse Plus C18 色谱柱具有相似的选择性,使得从旧式 Eclipse Plus C18 色谱柱到新型 Poroshell 120 EC-C18 色谱柱的方法转移简便易行,并可在原有耐压 400 bar 的 HPLC 系统上运行,实现低背压、缩短分析时间并节省溶剂。

参考文献

1. W. Long, and A. Mack, “使用 Agilent 1100 系列液相色谱配合安捷伦 Poroshell 120 EC-18 色谱柱对磺胺类药物进行快速分析,” 安捷伦出版物 5990-5572CHCN, 2010.

2. A. Gratzfeld-Hüsken, E. Naegel, “Maximizing efficiency using Agilent Poroshell 120 columns,” Agilent Technologies publication 5990-5602EN, 2010.
3. V. R. Meyer, “Practical High Performance Liquid Chromatography,” Fourth Ed., p 34, Wiley, 2004.
4. A. Brooks, and W. Long, “Selective Analysis of Non-Nutritive Food Additives Using Agilent ZORBAX Eclipse Plus 18, Eclipse Plus Phenyl-Hexyl, Eclipse XDB-Phenyl, and StableBond SB-Phenyl Columns,” Agilent Technologies publication 5989-9951EN, 2008.
5. J. Henderson, and J. Berry, “UHPLC of Polyphenols in Red Wine,” Agilent Technologies publication 5990-5659EN, 2010.

更多信息

如需了解更多有关我们产品和服务的信息,请访问我们的网站 www.agilent.com/chem/cn。

www.agilent.com/chem/cn

安捷伦公司对本材料所包含的错误,或由于提供、展示或使用本材料所造成的直接或间接损失概不负责。

本文中的信息、描述及性能指标等如有变更,恕不另行通知。

©安捷伦科技有限公司, 2010

中国印刷

2010 年 7 月 8 日

5990-6082CHCN



Agilent Technologies