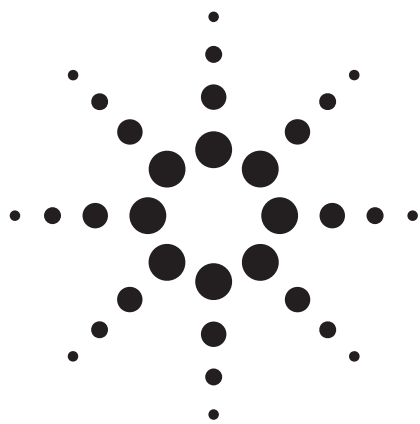




使用表面多孔性顆粒充填的安捷倫 Poroshell 120 EC-C18 管柱，以快速、低壓分析食品及飲料的添加劑

應用註解

食品及飲料

作者

Anne E. Mack 和 William J. Long
Agilent Technologies, Inc.
2850 Centerville Road
Wilmington, DE 19808
USA

摘要

11 種非營養性食品及飲料添加劑使用 3.0 mm × 100 mm 2.7 μm 的安捷倫 Poroshell 120 EC-C18 管柱，以醋酸銨／乙腈溶液進行梯度沖提，不到 3 分鐘，便完成分析。此分析的最大壓力未達 400 bar，標準型 HPLC 便能完成此分析法。此類安捷倫 Poroshell 120 EC-C18 管柱的選擇性及效率，近似 3.0 mm × 100 mm、1.8 μm 與 4.6 mm × 250 mm、5 μm 的安捷倫 ZORBAX Eclipse Plus C18 管柱。1.8 μm 的安捷倫 ZORBAX Eclipse Plus 管柱，雖然能在同樣時間內產生與安捷倫 Poroshell 120 管柱相同的分離結果，但最大壓力卻會超過 400 bar，必須使用能承受高壓力的 HPLC。相反的，以 5 μm 的安捷倫 ZORBAX Eclipse Plus 管柱進行分離，所產生的壓力低於 400 bar，但完成分離所需的時間卻相當長。本應用註解將證明，在 HPLC 中，將安捷倫 ZORBAX Eclipse Plus C18 管柱採用的舊分析方法，轉換至新安捷倫 Poroshell 120 EC-C18 管柱後，可節省大量時間，又不減損效率與選擇性。



Agilent Technologies

緒論

許多實驗室都使用傳統的 400-bar HPLC 系統，但在引入 UHPLC 後，就有了使用 2 μm 以下顆粒的需求。相較於傳統的 5 μm 粒子填充管柱，以 2 μm 以下顆粒填充的 HPLC 管柱時，不僅解析度高，分析時間也較短，但卻也會提高系統回壓。若想將目前使用的分析法，直接轉換成以 2 μm 以下顆粒填充管柱進行分析，但無預算購置耐高壓的 LC，則以表面多孔性顆粒填充的管柱便是最佳選擇。安捷倫 Poroshell 120 等類型的管柱，解析度與分析速度幾乎與 1.8 μm 顆粒填充的管柱相同，卻不會產生高背壓。

安捷倫 Poroshell 120 管柱填充粒子的質傳距離短，且粒徑分佈範圍明顯較窄，因此效率很高，幾乎等同於 2 μm 以下全多孔性顆粒。較大型的 2.7 μm 安捷倫 Poroshell 120 管柱填充顆粒，產生的背壓很低，約為 2 μm 以下全多孔性顆粒所產生的 40-60%，因此能加快分析速度，產生的壓力並不會超出 HPLC 的承受範圍。相較於 1.8 μm 管柱，使用 2 μm 濾片的安捷倫 Poroshell 120 管柱，較不會受不乾淨的樣品影響，更能順暢轉換至傳統 5 μm 管柱的分析法 [1-3]。

本應用註解說明如何將舊有分析法（使用較長的 5 μm 粒子填充管柱）移轉成類 UHPLC 分析法（使用較短的表面多孔性顆粒填充管柱）後，同時保持系統的背壓低於 400 bar。分析法轉換後的好處在於，幾乎任一 HPLC 系統都能減少樣品與移動相的溶液的耗用量，節省大量時間，而且具有與 2 μm 以下顆粒填充管柱分析比擬的選擇性與效率。

本文將分析一組 11 種非營養性食品及飲料添加劑，藉此證明此分析法移轉。這些化合物包含防腐劑、人工甜味劑、能量補充劑、香料等，適量攝取都對人體無害，但攝取過多時可能引發敏感及過敏反應 [4]，因此，檢測並定量這些添加劑非常重要。

實驗

採用安捷倫 1200 快速分離 LC (RRLC) 系統進行此分析：

- G1312B 二元幫浦 SL 推送移動相 A：20 mM 醋酸銨 (pH 4.80) 及 B：乙腈。梯度沖提為 t_0 時使用 14% B，再逐漸升高為 52% B。梯度沖提時間視管柱的尺寸與流速而變，列於表 1
- G1367C 自動液體注射器 (ALS) SL。4.6 mm $\times$ 250 mm 管柱的注入量為 11.8 μL ，3.0 mm $\times$ 100 mm 管柱為 2.0 μL
- G1316B 恆溫管柱室 (TCC) SL，溫度設定為 30 $^{\circ}\text{C}$
- G1315C 光二極體陣列偵測器 (DAD) SL，訊號設定為 230、4 nm，參照標準為 360、100 nm，使用一個 G1315-60024 微流動液槽（光徑 3 mm，容量 2 μL ）
- ChemStation B.04.01 版 (491) 軟體，操控 HPLC 並處理數據

表 1. 各種管柱的 HPLC 分析法參數

管柱	流速 (mL/分鐘)	梯度沖提時間 (分鐘)	沖提停止時間 (分鐘)	平衡時間的時間 (分鐘)
安捷倫 ZORBAX Eclipse Plus C18 管柱， 4.6 mm $\times$ 250 mm、5.0 μm	1.000	12.00	13.10	7.00
安捷倫 ZORBAX Eclipse Plus C18 管柱， 3.0 mm $\times$ 100 mm、3.5 μm	0.638	3.00	3.50	2.00
安捷倫 ZORBAX Eclipse Plus C18 管柱， 3.0 mm $\times$ 100 mm、1.8 μm	0.851	2.10	2.60	1.80
安捷倫 Poroshell 120 EC-C18 管柱， 3.0 mm $\times$ 100 mm、2.7 μm	0.851	2.10	2.60	1.80

本分析採用下列 4 種安捷倫管柱：

- 安捷倫 Poroshell 120 EC-C18 管柱，3.0 mm × 100 mm、2.7 μm (p/n 695975-302)
- 安捷倫 ZORBAX Eclipse Plus C18 管柱，3.0 mm × 100 mm、1.8 μm (p/n 959964-302)
- 安捷倫 ZORBAX Eclipse Plus C18 管柱，3.0 mm × 100 mm、3.5 μm (p/n 959961-302)
- 安捷倫 ZORBAX Eclipse Plus C18 管柱，4.6 mm × 250 mm、5 μm (p/n 959990-902)

待驗化合物及其結構、pKa 值及添加後的功能，均列於圖 1。待驗化合物均溶於水，濃度製備成 1 mg/mL。再各取等量，混合成樣品混合液。待驗化合物皆購自 Sigma Aldrich 公司（賓州 Bellefonte 市），乙腈及醋酸銨也購自 Sigma Aldrich 公司，水則採用 18 M-Ω Milli-Q 水（麻州 Bedford 市）。

結果及討論

以 4.6 mm × 250 mm、5 μm 的傳統安捷倫 ZORBAX Eclipse Plus C18 管柱，13 分鐘內完成分析 11 種食物及飲料添加劑的分離結果，如圖 2 所示。圖 3 為 3.0 mm × 100 mm、3.5 μm 的安捷倫

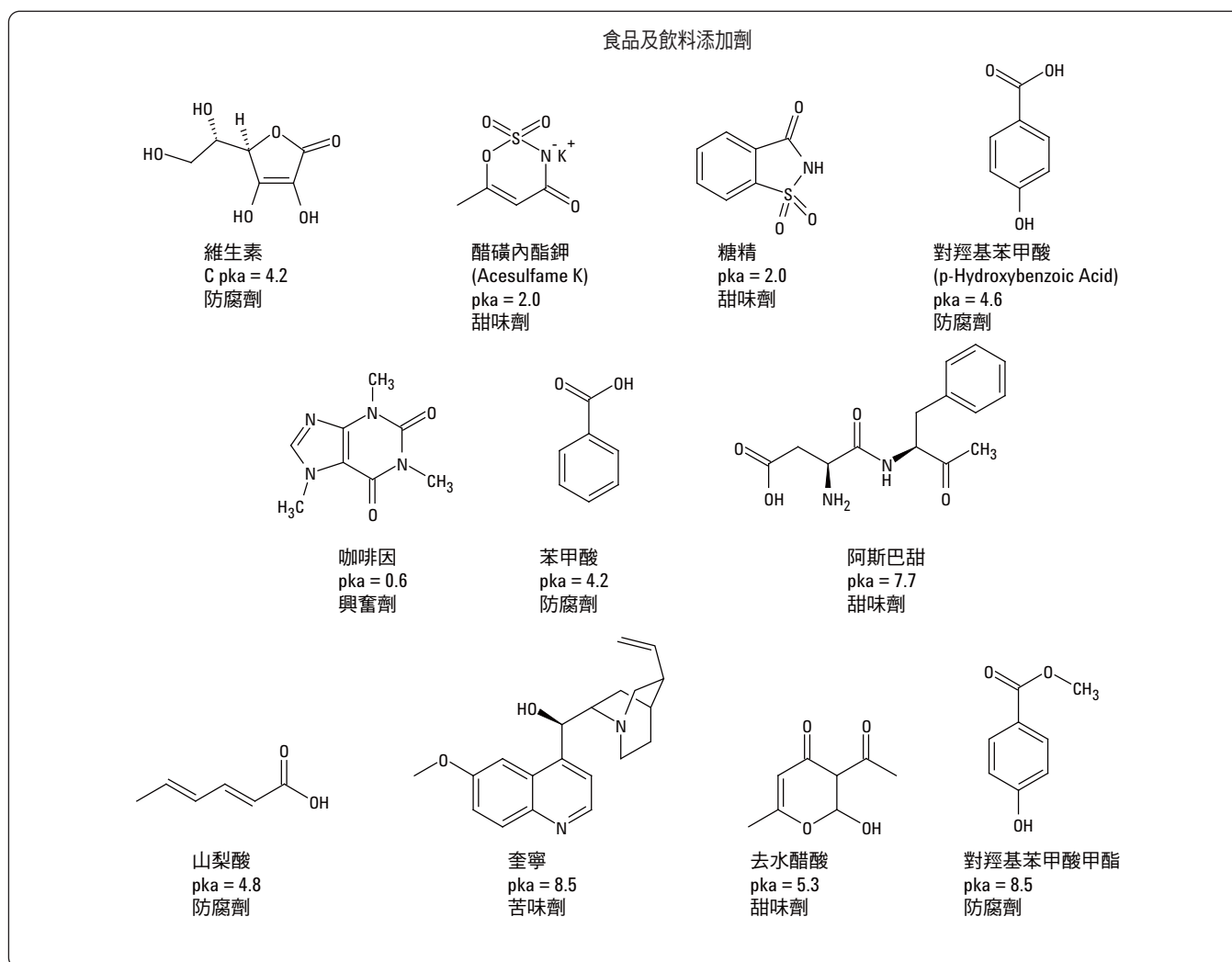


圖 1. 待驗化合物

ZORBAX Eclipse Plus C18 管柱所完成的相同分離結果，分析時間大幅縮減為 3.5 分鐘。本分析的流速經過調整，以符合較小的內徑及較小的充填顆粒。本次分析中，3.5 μm 管柱並未將兩對波峰對分離：苯甲酸／阿斯巴甜和去水醋酸／對羟基苯甲酸甲酯。圖 4 為 3.0 mm $\times$ 100 mm、1.8 μm 的安捷倫 ZORBAX Eclipse Plus C18 管柱所完成的相同分離結果。沖提 1.8 μm 管柱的流速，已調整成最適合較小型 2 μm 以下顆粒的流速。所有化合物均在 2.5 分鐘內分離出來。分析速度加快，可提高實驗室的產能，並減少移動相與溶劑的消耗量。較小型的 3.0 mm $\times$ 100 mm 管柱需注

入的樣品量較少，因此能節省樣品。然而以此類 2 μm 以下顆粒分離優點代價，會產生較高背壓 (483 bar)，需使用耐高壓的 LC 系統。圖 5 顯示 3.0 mm $\times$ 100 mm、2.7 μm 的安捷倫 Poroshell 120 EC-C18 表面多孔性顆粒充填管柱所完成的相同分離結果，分析時間較 1.8 μm 管柱短。此分離結果的附加優點是背壓較低 (356 bar)。100 bar 的壓力差是相當大的差距，因為這會影響需使用耐高壓的 HPLC 系統還是只需傳統系統（最多能承受 400 bar）便能完成此分析。

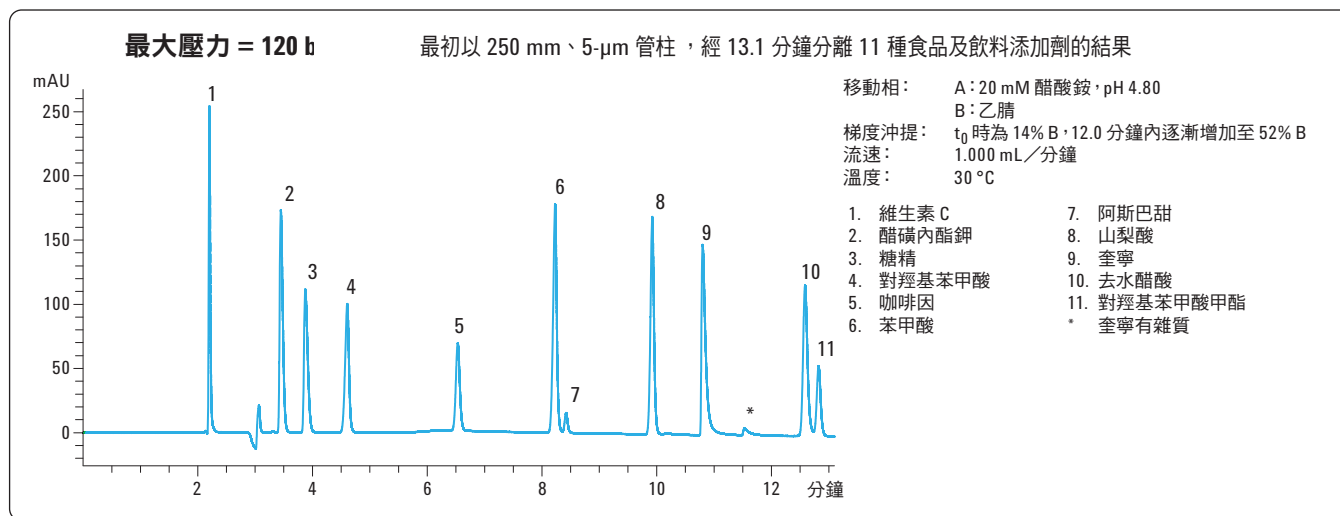


圖 2. 4.6 mm $\times$ 250 mm、5 μm 的安捷倫 ZORBAX Eclipse Plus C18 管柱，以醋酸銨／乙腈進行梯度沖提，分離 11 種食物及飲料添加劑的結果

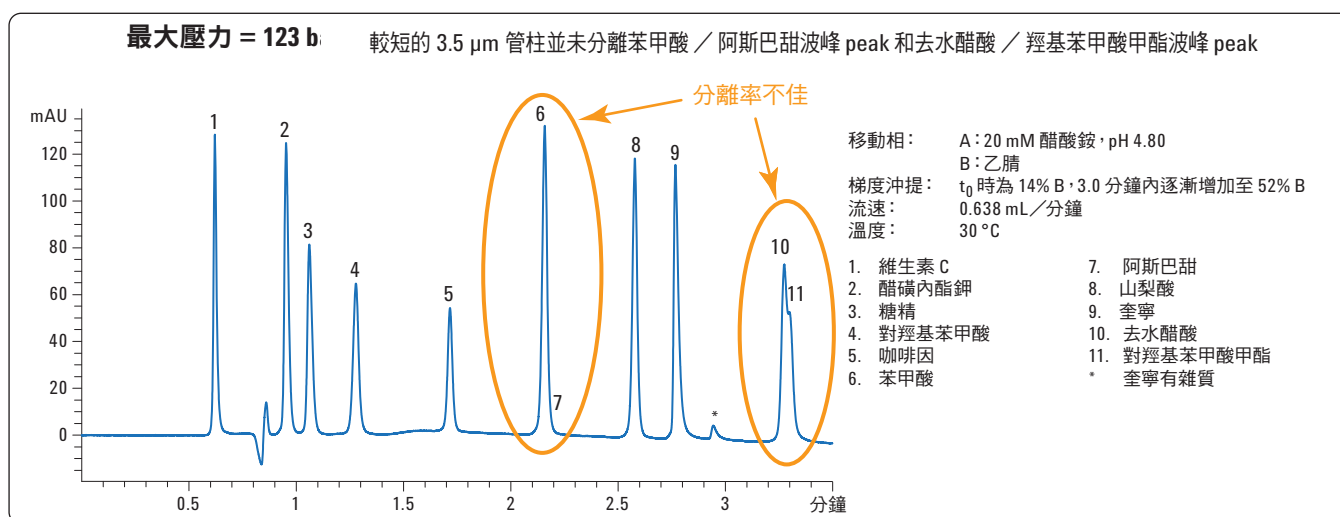


圖 3. 3.0 mm $\times$ 100 mm、3.5 μm 的安捷倫 ZORBAX Eclipse Plus C18 管柱，以醋酸銨／乙腈進行梯度沖提，分離 11 種食物及飲料添加劑的結果

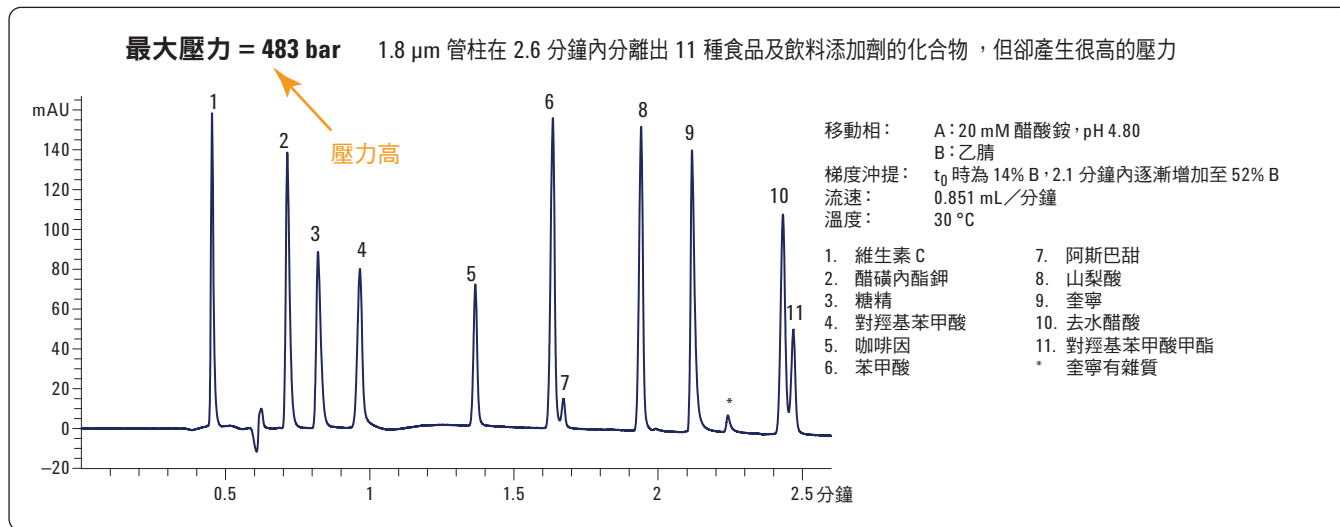


圖 4. 3.0 mm $\times$ 100 mm、1.8 μm 的安捷倫 ZORBAX Eclipse Plus C18 管柱，以醋酸鉍 / 乙腈進行梯度沖提，分離 11 種食物及飲料添加劑的結果

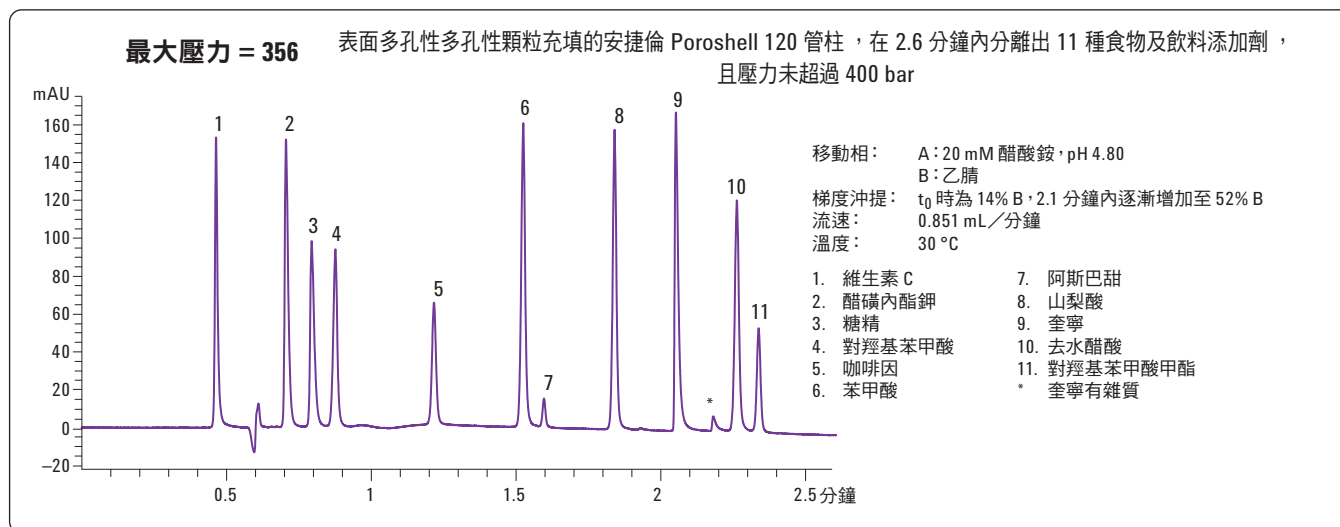


圖 5. 3.0 mm $\times$ 100 mm、2.7 μm 、表面多孔性顆粒充填的安捷倫 Poroshell 120 EC-C18 管柱，以醋酸鉍 / 乙腈進行梯度沖提，分離 11 種食物及飲料添加劑的結果

圖 6 將最初 5 μm 管柱分離的結果，與新安捷倫 Poroshell 120 管柱的分離結果疊圖比較。分析時間自 13.1 分鐘縮短為 2.6 分鐘，沖提後的時間自 7 分鐘縮短為 1.8 分鐘，可節省超過 80% 的溶劑與移動相。較長的 5 μm 安捷倫 ZORBAX Eclipse Plus 管柱，對臨界波峰對（去水醋酸／對經基苯甲酸甲酯）的解析度為 1.79，安捷倫 Poroshell 120 管柱則提高至 3.01。請注意，圖 6 中安捷倫 Poroshell 120 管柱沖提的末波峰，滯留時間幾乎與 5 μm 安捷倫 ZORBAX Eclipse Plus 管柱的第一個波峰相同。

4 種消費品的樣品，不到 2.6 分鐘便成功完成分析，且壓力未超過 400 bar（圖 7）。能量補給飲料含有咖啡因、苯甲酸、山梨

酸；無糖汽水含有糖精、咖啡因、苯甲酸、阿斯巴甜；漱口水含有糖精與苯甲酸；無糖口香糖含有醋磺內酯鉀與阿斯巴甜。

若具有高處理量的需求，則在 HPLC 系統的限制範圍內，可升高流速，但會些微減損層析品質，如圖 8 所示。沖提 3.0 mm $\times$ 100 mm 的安捷倫 Poroshell 120 管柱時，流速可自 0.851 mL/分鐘，調高為 1.489 mL/分鐘，以進一步縮短 40% 分析時間，而壓力則低於 600 bar。此方式幾乎不會降低臨界波峰對的分離率，對條件峰容量 (nc) 的影響也很小 [5]。此結果為在背壓低於 600 bar 下，1.5 分鐘完成分析 11 種化合物的分離結果基準。

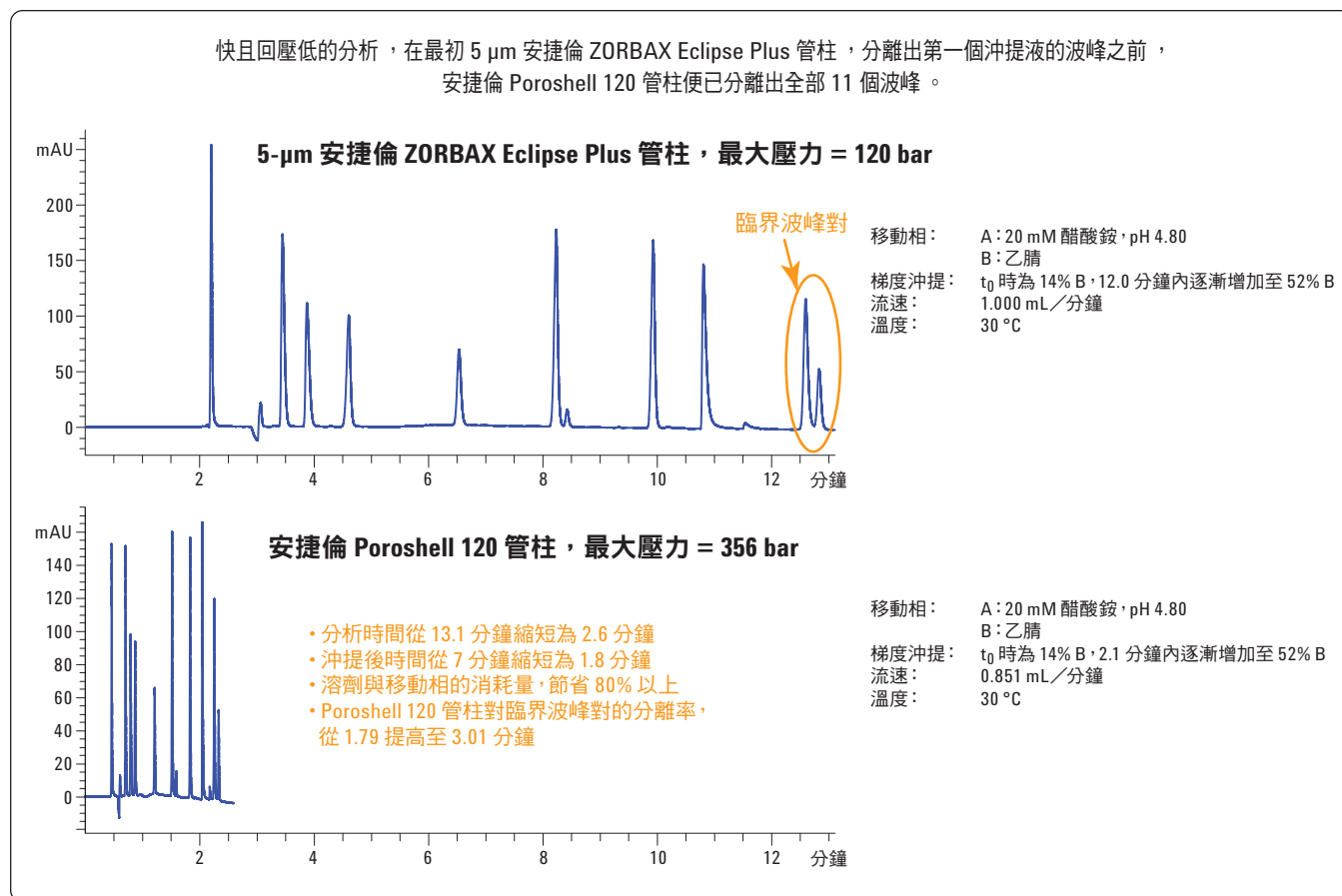


圖 6. 疊圖比較最初的 5 μm 管柱，與新安捷倫 Poroshell 120 管柱的分離結果

4 種消費品的樣品均在 2.6 分鐘內成功完成分析，且壓力未超過 400 bar

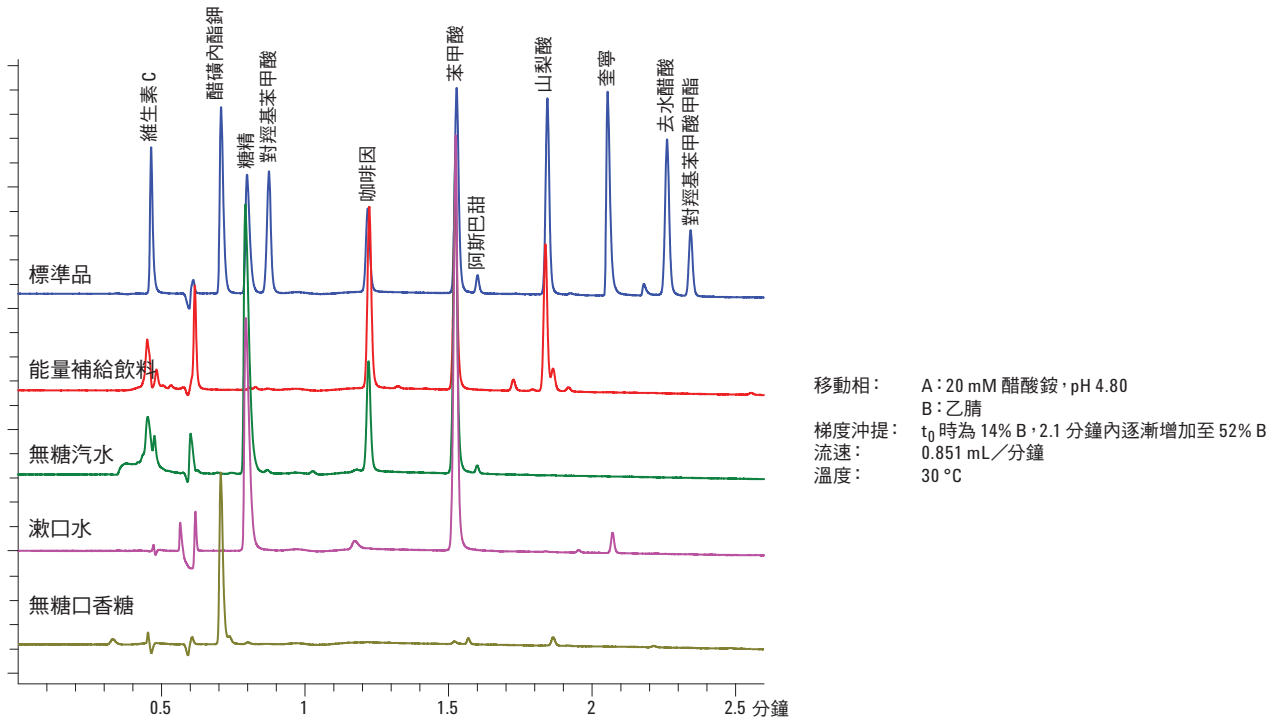


圖 7. 以 3.0 mm × 100 mm、2.7 μm、表面多孔性顆粒充填的安捷倫 Poroshell 120 EC-C18 管柱，分析 4 種消費品的樣品

沖提安捷倫 Poroshell 120 管柱的流速可升高以進一步增加處理量，對解析度和條件峰容量 (n_c) 的影響很小

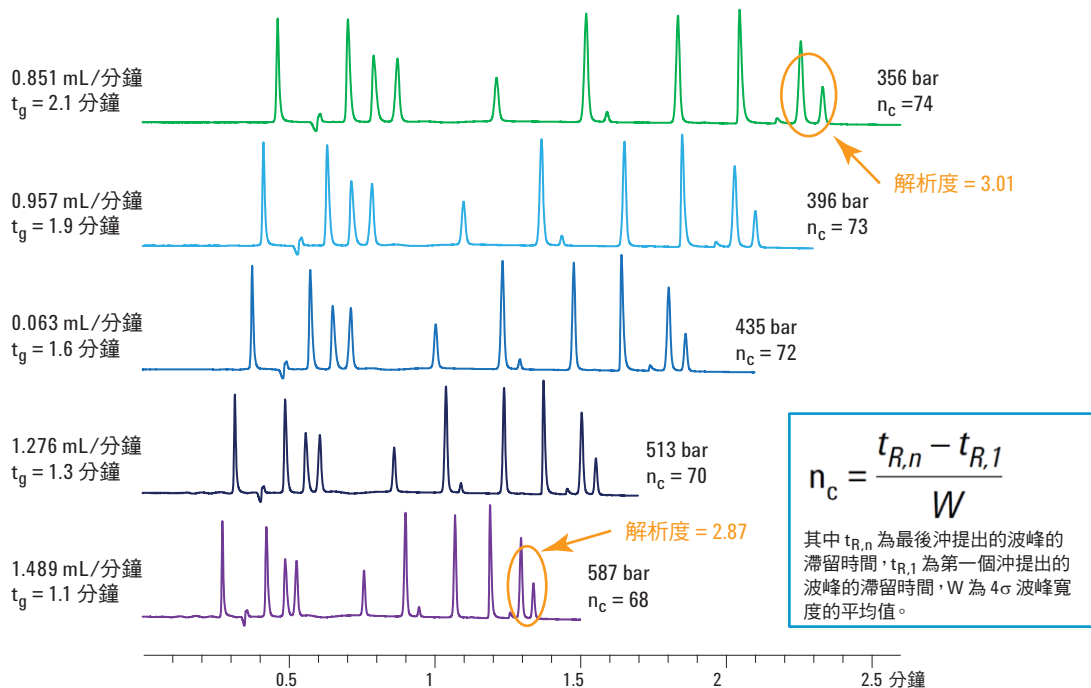


圖 8. 疊圖顯示提高沖提安捷倫 Poroshell 120 管柱的流速後，對層析品質的影響

結論

相較於以傳統全多孔性顆粒充填的管柱，表面多孔性顆粒充填的 HPLC 管柱具有許多優勢。表面多孔性顆粒充填的 2.7 μm 安捷倫 Poroshell 120 EC-C18 管柱，效率與選擇性均幾乎等同於 1.8 μm 的安捷倫 ZORBAX Eclipse Plus C18 管柱，卻不會產生高背壓。以較大 5 μm 顆粒充填的較長型管柱，雖然具有相同的效率，也不會產生高背壓，但卻大幅延長分析時間。由於 Poroshell 120 EC-C18 管柱的選擇性，近似於 Eclipse Plus C18 管柱，因此舊型 Eclipse Plus C18 管柱使用的分析法，可輕易移轉至新 Poroshell 120 EC-C18 管柱，以降低背壓，在耐 400 bar 壓力的 HPLC 系統中使用，不僅能縮短分析時間，還能節省溶劑。

參考資料

1. W. Long 和 A. Mack。《以安捷倫 1100 系列 LC 搭配安捷倫 Poroshell 120 EC-C18 管柱，快速分析磺胺類藥物》(Fast Analysis of Sulfa Drugs using the Agilent 1100 Series LC with Agilent Poroshell 120 EC-C18 columns)。安捷倫科技出版品 5990-5572EN。2010 年。
2. A. Gratzfeld-Hüsken 和 E. Naegele。《使用安捷倫 Poroshell 120 管柱提升效率》(Maximizing efficiency using Agilent Poroshell 120 columns)。安捷倫科技出版品 5990-5602EN。2010 年。
3. V. R. Meyer。《實用高效液相層析》(Practical High Performance Liquid Chromatography) 第四版，34 頁。Wiley 出版。2004 年。
4. A. Brooks 和 W. Long。《以 ZORBAX Eclipse Plus 18、Eclipse Plus Phenyl-Hexyl、Eclipse XDB-Phenyl 及穩定鍵結 SB-Phenyl 的管柱，選擇分析非營養性食品添加劑》(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)。安捷倫科技出版品 5989-9951EN。2008 年。
5. J. Henderson 和 J. Berry。《以 UHPLC 分析紅酒中的多酚類物質》(UHPLC of Polyphenols in Red Wine)。安捷倫科技出版品 5990-5659EN，2010 年。

詳細資訊

有關本公司產品與服務的其他資訊，請造訪本公司的網站：
www.agilent.com/chem。

www.agilent.com/chem

本文內容如有任何錯誤，或是因為提供、實行或使用本資料，造成附帶或衍生損害，安捷倫恕不負責。

本文件中的資訊、說明和規格可能隨時變更，恕不另行通知。

© 安捷倫科技公司，2010 年
於美國印製
2010 年 7 月 8 日
5990-6082CHTW



Agilent Technologies