

## 将Arc HPLC与2414 RI检测器联用评估 XBridge™ BEH Amide色谱柱分析食品和饮料中五种糖的性能

---

Kim Van Tran, Euan Ross, Peter Hancock

Waters Corporation

---

### 摘要

单糖（果糖和葡萄糖）和双糖（蔗糖、麦芽糖和乳糖）等糖类是食品和饮料的常规检测项目。该测试可用于产品开发和重新配方，以及确认标签声明，并确保产品的一致性、安全性和真实性。

高效液相色谱(HPLC)是一种分析食品和饮料所含糖的常用技术。HPLC能够分离单糖和双糖，提供有关样品所含糖及其数量的信息。

本应用纪要的目的是使用一种简单的等度方法，比较两种不同粒径和柱长的XBridge BEH Amide色谱柱分析五种糖的性能。使用Waters™方法转换器将之前发布的方法从4.6 mm x 250 mm, 3.5 μm色谱柱转移到4.6 mm x 150 mm, 2.5 μm色谱柱。运行时间明显缩短，流动相消耗有所减少。比较每种色谱柱的方法性能标准，例如线性、USP峰分离度，以及保留时间和峰面积的精密度。将Arc™ HPLC与2414 RI检测器联用，评估等度方法在两种XBridge BEH Amide色谱柱上的性能。

### 优势

- XBridge BEH Amide色谱柱可以采用一种简单的等度方法保留和分离果糖、葡萄糖、蔗糖、麦芽糖和乳糖
-

- XBridge BEH Amide色谱柱、Arc HPLC和2414检测器搭配使用能够对各种食品和饮料样品中存在的糖进行分析 and 定量
- XBridge BEH Amide XP色谱柱经过测试，搭配Arc HPLC使用时可减少运行时间和溶剂消耗

---

## 简介

糖是食品和饮料中天然存在或后期添加的一类物质，可提供一系列功能。糖不仅能提供甜味，还会影响质地，用作填充剂、防腐剂，以及为发酵中的酵母提供底物<sup>1</sup>。

常规检测食品和饮料中的单糖（果糖和葡萄糖）和双糖（蔗糖、麦芽糖和乳糖）等糖类，可用于产品开发和重新配方，以及确认标签声明，并确保产品的一致性、安全性和真实性。

高效液相色谱(HPLC)是一种分析食品和饮料所含糖的常用技术。HPLC能够分离单糖和双糖，提供有关样品所含糖及其数量的信息。在进行HPLC分析之前，有几种食品和饮料通常只需要很少的样品前处理工作，即可采用准确、可靠和高效的方法来确保产品符合质量标准并满足标签声明。

但是，单糖和双糖的分析存在一些挑战，因为它们不会在常用的反相C<sub>18</sub>色谱柱上保留，且化合物结构中缺乏强发色团。而使用紫外可见光(UV-Vis)的替代检测器（例如示差折光(RI)检测）和替代色谱分离技术（例如亲水作用液相色谱(HILIC)）可以克服这些挑战。

本应用纪要将介绍和比较两种不同粒径和柱长的XBridge BEH Amide色谱柱使用一种简单的等度方法保留和分离五种糖的性能。利用配有2414示差折光(RI)检测器的Arc HPLC系统进行分析。

---

## 实验

### 材料与试剂

果糖、葡萄糖、蔗糖、麦芽糖和乳糖购自Sigma Aldrich。

乙腈和甲醇（HPLC级）购自Honeywell Research Chemicals。

三乙胺购自Sigma Aldrich。

水使用PureLab flex ELGA系统（美国LabWater）制得。

含糖产品购自当地零售商（马萨诸塞州）。

## 样品前处理

制备校准标准品

用水制备浓度为100 mg/mL的糖标样，储存于4 °C下。用50:50乙腈:水连续稀释，制得浓度为5 mg/mL的糖混标。校准曲线范围为0.08~5 mg/mL。

用50:50的乙腈和水按1:4的比例稀释儿童有机混合果汁、橙汁、运动饮料和脱脂牛奶的四个重复样。然后将样品涡旋混合1分钟，以4000 rpm离心5分钟，并使用0.2 µm PVDF针式过滤器过滤。

称取3 g面包样品溶于25 mL 50:50的乙腈和水中。然后将样品涡旋混合1分钟，以4000 rpm离心5分钟，并使用0.2 µm PVDF过滤器过滤。

色谱柱1进样15 µL样品，色谱柱2进样9 µL样品。

饮料样品需要进一步稀释，使其浓度在校准曲线的浓度范围内。不同食品和饮料所含糖的类型和含量各不相同，因此需要优化样品稀释步骤，确保样品在溶剂标准品校准曲线的浓度范围内。

## 液相色谱条件

液相色谱系统:	Arc HPLC系统
检测:	RI检测（采集速率：10点/秒）
检测器温度:	35 °C
样品瓶:	LCGC认证透明玻璃12×32 mm螺口全回收样品瓶，配有瓶盖和PTFE/硅胶隔垫， 容积1.5 mL (P/N: 186007201C)
过滤器:	0.2 µm PVDF针式过滤器 (P/N: WAT200806)

色谱柱:	XBridge BEH Amide色谱柱, 130 Å, 3.5 μm, 4.6 mm x 250 mm P/N: 186004870 (色谱柱1) XBridge BEH Amide色谱柱, 130 Å, 2.5 μm, 4.6 mm x 150 mm P/N: 186006726 (色谱柱2)
柱温:	35 °C
样品温度:	25 °C
进样体积:	15 μL和9 μL
流速:	1.0 mL/min和1.4 mL/min
流动相:	75:25乙腈:水+ 0.2%三乙胺
样品稀释剂:	50:50乙腈:水
密封件清洗液:	5:95乙腈:水
洗针液:	5:95乙腈:水
清除溶剂:	50:50乙腈:水

---

## 结果与讨论

这项简单的研究旨在比较两种不同粒径和柱长的XBridge BEH Amide色谱柱分析五种常见糖的性能。使用相同的HPLC系统、流动相和样品来比较两种色谱柱的性能。使用沃特世方法转换计算器（图1）将之前发布的方法条件从4.6 mm x 250 mm, 3.5 μm色谱柱（色谱柱1）转移到4.6 x 150 mm, 2.5 μm色谱柱（色谱柱2）<sup>2-3</sup>。

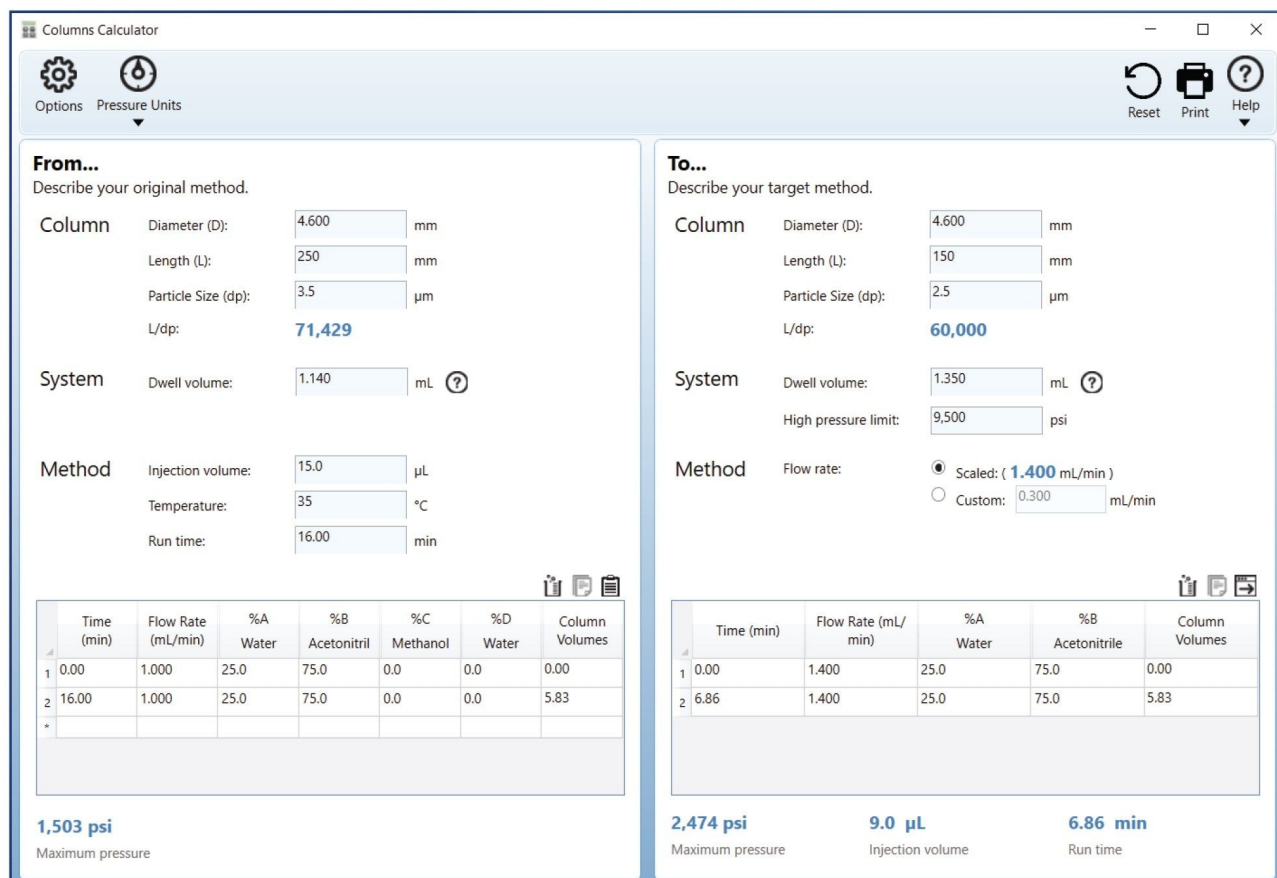


图1.沃特世方法转换计算器的缩放方法转移示例。

使用小粒径固定相的现代LC色谱柱可提供更高的色谱效率。使用小粒径固定相时应调整色谱柱尺寸，以适应所用LC系统的扩散体积。小粒径色谱柱还会带来更高的背压，因此系统只有在正确的流速下才能使小粒径色谱柱发挥理想性能。缩放后的小粒径色谱柱方法流速增加到1.4 mL/min；但预期背压完全在Arc HPLC系统的压力限制(9,500 psi)范围内。运行等度方法时，用柱长除以粒径(L/dp)可以大致计算出色谱柱的最大分离能力<sup>4</sup>。色谱柱1的L/dp为71,400，而色谱柱2的L/dp为60,000，因此不同糖之间的分离效果较差。色谱柱2的大致运行时间为6.86分钟，缩短大约57%。由于运行时间缩短，即使流速增加，色谱柱2每次进样的流动相消耗也能减少到6 mL及以下。

比较相同溶剂标准品进样到各色谱柱的结果见图2。正如方法转换计算器工具所示，使用色谱柱2可以大幅缩短运行时间，最后一个峰（乳糖，6分钟）的洗脱时间早于色谱柱1的第一个峰（果糖，6.9分钟）的洗脱时间。

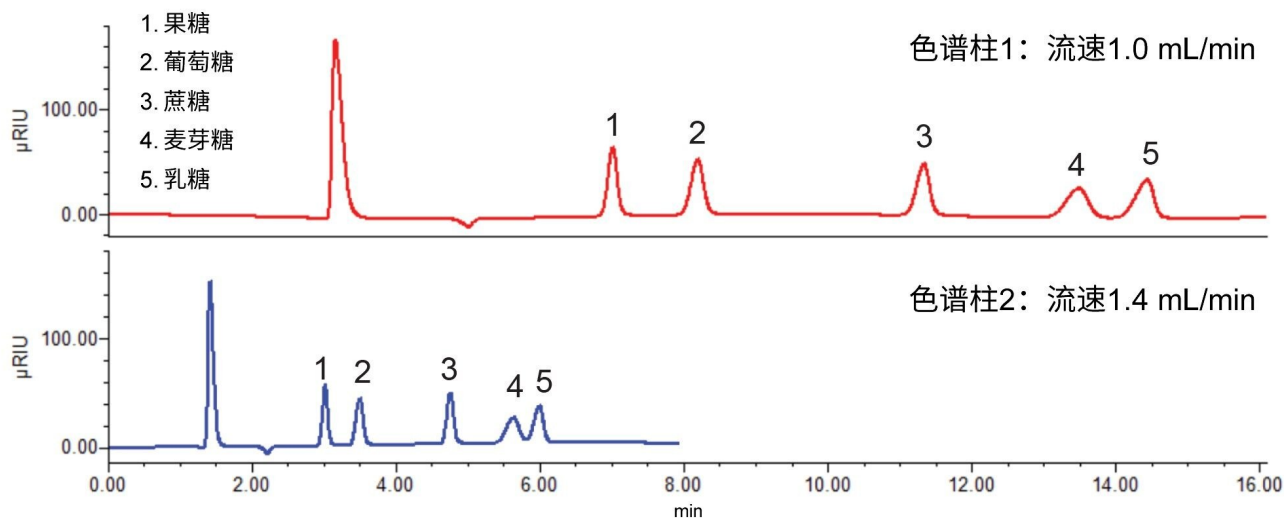


图2.比较两种XBridge BEH Amide色谱柱上溶剂标准品(5 mg/mL)的色谱图

表1比较了使用Empower™ CDS软件计算的峰保留时间和USP分离度。根据FDA指南，在评估相邻洗脱峰之间的分离时，典型的最小分离度值为2.0 ( $R_s > 2.0$ )<sup>5</sup>。色谱柱1能够使所有峰都达到该分离度，而在色谱柱2上，麦芽糖和乳糖（峰4和5）之间的分离度只有1.3。对于不含乳糖和麦芽糖的样品，色谱柱2应是一个实用的选择。在色谱柱2中，所有分离的USP分离度均有所降低，这是分离能力(L/dp)降低的预期结果。

峰编号	保留时间 色谱柱1	USP分离度 色谱柱1	保留时间 色谱柱2	USP分离度 色谱柱2
1. 果糖	6.9		3.0	
2. 葡萄糖	8.2	4.2	3.5	2.9
3. 蔗糖	11.3	9.6	4.8	6.9
4. 麦芽糖	13.4	5.3	5.6	3.7
5. 乳糖	14.3	2.0	6.0	1.3

表1.比较两种XBridge BEH Amide色谱柱的保留时间和峰分离度

## 校准曲线：线性

使用50:50的水和乙腈连续稀释糖样品，制备两份多点校准曲线重复样。校准范围为0.08 mg/mL~5.0 mg/mL。两

种色谱柱均表现出优异的线性( $R^2 > 0.999$ )。两种色谱柱的校准曲线见图3。

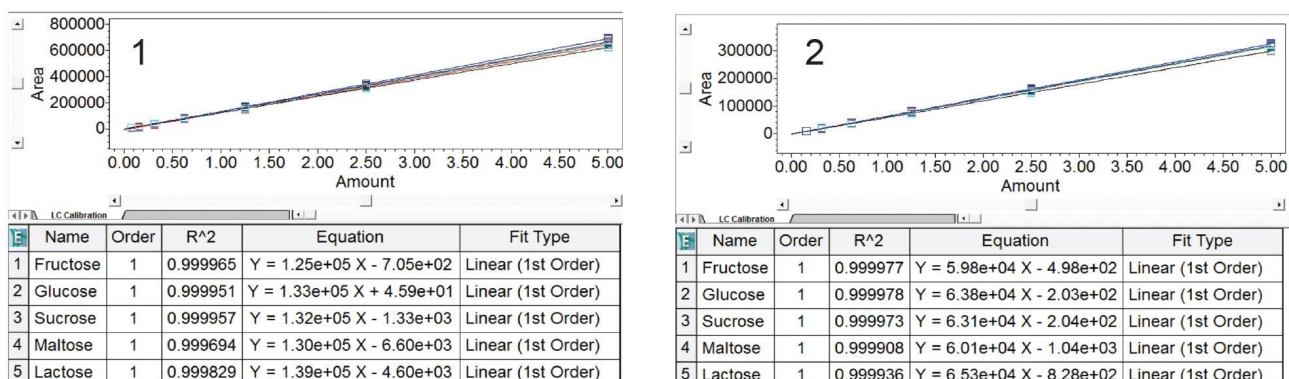


图3.4.6  $6\text{ mm} \times 250\text{ mm}$ ,  $3.5\text{ }\mu\text{m}$ 色谱柱(1)和 $4.6\text{ mm} \times 150\text{ mm}$ ,  $2.5\text{ }\mu\text{m}$ 色谱柱(2)上被测糖的校准曲线

## 峰面积和保留时间的重现性

在每种色谱柱上重复进样六次 $5\text{ mg/mL}$ 标准品，评估所测试的5种糖中每一种的保留时间和峰面积重现性。评估结果见表2。

峰编号	保留时间% RSD 色谱柱1	峰面积% RSD 色谱柱1	保留时间% RSD 色谱柱2	峰面积% RSD 色谱柱2
1. 果糖	0.1	0.2	0.2	0.4
2. 葡萄糖	0.1	0.1	0.2	0.4
3. 蔗糖	0.1	0.4	0.3	0.3
4. 麦芽糖	0.1	1.1	0.3	0.4
5. 乳糖	0.1	0.9	0.3	0.5

表2. 比较两种XBridge BEH Amide色谱柱的保留时间( $n=6$ )和峰面积( $n=6$ )的% RSD

## 产品中的糖分析

制备四份重复样品，每种样品中测得的糖含量如表3所示。

色谱柱1	总标示量, 克/份	总检出量, 克/份	果糖检出量 (% RSD)	葡萄糖检出量 (% RSD)	蔗糖检出量 (% RSD)	麦芽糖检出量 (% RSD)	乳糖检出量 (% RSD)
有机混合果汁	9.0	8.9	5.3 (2)	3.6 (1)	N/A	N/A	N/A
橙汁	24.0	21.6	5.7 (2)	4.8 (1)	11 (4)	N/A	N/A
运动饮料	21.0	22.6	7.9 (2)	8.9 (2)	5.7 (1)	N/A	N/A
脱脂牛奶	12.0	11.2	N/A	N/A	N/A	N/A	11.2 (1)
面包	1.0	1.5	0.7 (2)	0.4 (2)	0.0	0.4 (3)	N/A

色谱柱2	总标示量, 克/份	总检出量, 克/份	果糖检出量 (% RSD)	葡萄糖检出量 (% RSD)	蔗糖检出量 (% RSD)	麦芽糖检出量 (% RSD)	乳糖检出量 (% RSD)
有机混合果汁	9.0	8.8	5.1 (0.9)	3.7 (0.7)	N/A	N/A	N/A
橙汁	24.0	20.7	5.3 (4.2)	4.8 (3.9)	10.6 (4.0)	N/A	N/A
运动饮料	21.0	21.7	7.3 (1.8)	8.8 (1.6)	5.6 (1.6)	N/A	N/A
脱脂牛奶	12.0	12.5	N/A	N/A	N/A	N/A	12.5 (1.8)
面包	1.0	1.5	0.7(2.6)	0.4 (2.3)	0.0	0.4 (4.4)	N/A

表3. 色谱柱1和色谱柱2在被测样品中测得的糖含量

将每种糖的计算量相加计算总含量，并与产品标签上标示的糖含量（克/份）进行比较。除面包样品外，所有样品都需要额外稀释，以拟合校准曲线的浓度范围。这项简单的评估通过减少不同样品的进样体积来实现这一点。离线优化样品稀释可使样品的柱上进样量拟合溶剂标准品校准曲线的浓度范围，标准品和样品的进样体积相同。可以添加稀释因子到Empower CDS软件的样品列表中，以便在数据处理过程中自动计算未稀释的样品浓度。每种色谱柱上被测样品的色谱图示例见图4。



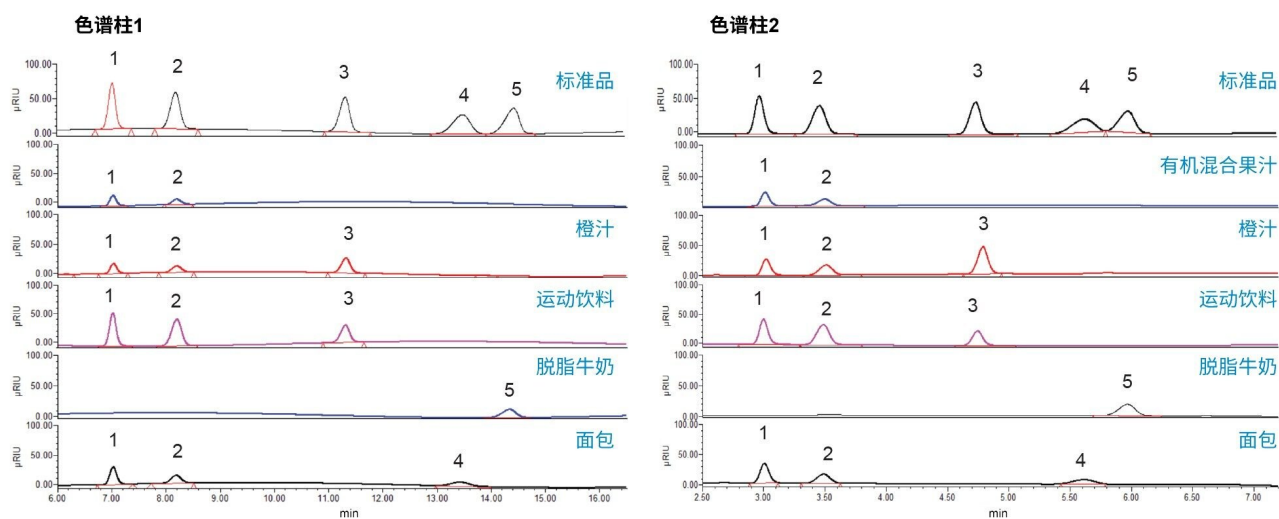


图4. 色谱柱1和色谱柱2上被测样品的示例色谱图。峰洗脱顺序为：1.果糖，2.葡萄糖，3.蔗糖，4.麦芽糖，5.乳糖。

## 结论

本应用纪要的目的是比较两种不同粒径和柱长的XBridge BEH Amide色谱柱分析五种糖的性能。沃特世方法转换计算器工具成功地将方法从4.6 mm x 250 mm, 3.5 μm色谱柱转移到4.6 mm x 150 mm, 2.5 μm色谱柱。两种色谱柱均采用简单的等度方法，将Arc HPLC与2414示差折光检测器联用。将该方法缩放转移到4.6 mm x 150 mm, 2.5 μm色谱柱可显著缩短运行时间并减少流动相消耗。该方法在两种色谱柱上都表现出优异的线性，并且对五种糖的保留时间和峰面积提供了良好的精密度。XBridge BEH Amide色谱柱、Arc HPLC和2414检测器搭配使用经证明能够对各种食品和饮料样品中存在的糖进行分析和定量。

## 参考资料

1. Sugars. Institute of Food Science & Technology (IFST). 2017.  
<https://www.ifst.org/lovefoodlovescience/resources/sugars>.

2. 方法转换计算机版本2.0. <<https://www.waters.com/nextgen/global/shop/product-selection-tools-resources.htmlsources.html>>
3. XBridge Amide HPLC Columns Applications Notebook.Waters Corporation. 720003438 <<https://www.waters.com/webassets/cms/library/docs/720003438en.pdf>> . 2010; p16.
4. Beginners Guide to UPLC: [The Promise of Small Particles](#).Waters Corporation.
5. FDA Center for Drug Evaluation and Research.(November 1994).Reviewer Guidance, Validation of Chromatographic Methods <https://www.fda.gov/media/75643/download><<https://www.fda.gov/media/75643/download>>.

---

## 特色产品

Arc HPLC系统 <<https://www.waters.com/waters/nav.htm?cid=135068659>>

ACQUITY UPLC H-Class PLUS系统 <<https://www.waters.com/10138533>>

2414示差折光(RI)检测器 <<https://www.waters.com/waters/514425>>

720007835ZH, 2022年12月

© 2023 Waters Corporation. All Rights Reserved.

[使用条款](#) [隐私](#) [商标](#) [网站地图](#) [招聘](#) [Cookie](#) [Cookie设置](#)

沪ICP备06003546号-2 京公网安备 31011502007476号