

合成色素的超快速液相色谱质谱分析

岛津制作所分析计测事业部应用技术部

1. 前言

近年来,要求分析高通量化的呼声越来越高。在液相色谱法方面,通过减小色谱柱填料粒径,从而降低理论塔板高度,提高流动相线速度,是实现快速化有效的途径。但是,需要注意亚2 μm 的填料存在压力损失大、重现性等问题。除了时间缩短之外,分离·重现性也是重要的参数。将色谱柱压设定在30MPa以下时,2.0-2.5 μm 的粒径可以获得最好的分离度。为此,我们开发了超快速液相色谱装置(UFLC)和粒径为2.2 μm 的ODS色谱柱。

我们将食品卫生法容许使用的12种合成色素成分以及容许使用和未容许使用的共计30种色素成分作为样品,通过使用光电二极管阵列(PDA)检测器进行定量分析,以及使用电喷雾离子化/离子阱/飞行时间型质谱分析仪(ESI/QIT/TOFMS)进行定性分析,对分析系统进行了评价。

2. 方法

- 1) 使用在日本国内容许使用的12种合成色素成分(Fig. 1)对LC-PDA系统进行了评价。
- 2) 装置:岛津制作所Prominence UFLC系统,分析色谱柱:岛津制作所Shim-pack XR-ODS(75mmL \times 3.0 mm I.D., 2.2 μm),流动相:A:50 mM醋酸铵缓冲液(pH 4.7)、B:100 mM醋酸铵缓冲液(pH 4.7)/乙腈=1/1,流速:1.0 mL/min,进行梯度洗脱(10%B(0min)-50%B(0.5-0.6 min)-100%B(2.6-3.0 min)-10%B(3.01-6.5 min))。进样量:4 μL ,检测波长:450、520、620 nm。
- 3) LC-ESI/QIT/TOFMS测定使用岛津制作所LCMS-IT-TOF,准备了上述12种成分等共计30种合成色素成分。分析色谱柱:岛津制作所Shim-pack XR-ODS(75 mmL \times 2.0 mm I.D., 2.2 μm),流动相:A:50 mM醋酸铵缓冲液(pH 4.7),B:50 mM醋酸铵缓冲液(pH 4.7)/乙腈,流速:0.5 mL/min,进行梯度洗脱(5%B(0min)-100%B(9-10 min)-5%B(10.01-13 min))。进样量:5 μL 。以自动极性转换方式进行了精密质量测定(至MS/MS),并使用Formula Predictor进行了组成推断。

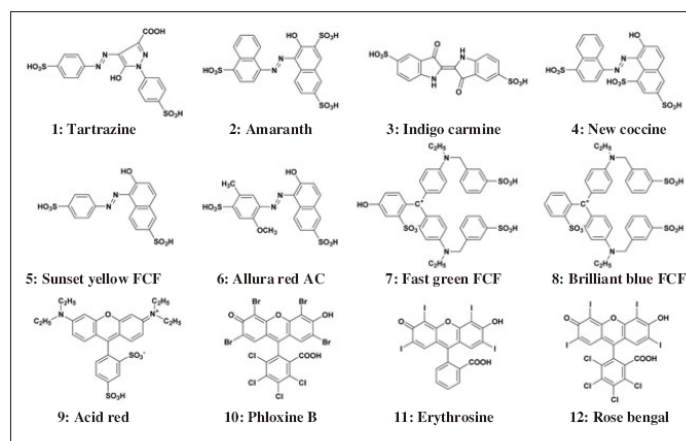


Fig. 1 : Artificial colorings.

3. 结果

- 1) UFLC-PDA测定的分析时间可设置为3min,缩短至常规LC分析时间的1/6左右(Fig. 2)。

2) 各成分的保留时间重现性 (%RSD)、面积值重现性 (%RSD) 都分别在0.11%、0.15%以内, 在保持了精度的状态下实现了时间缩短 (Table 1)。

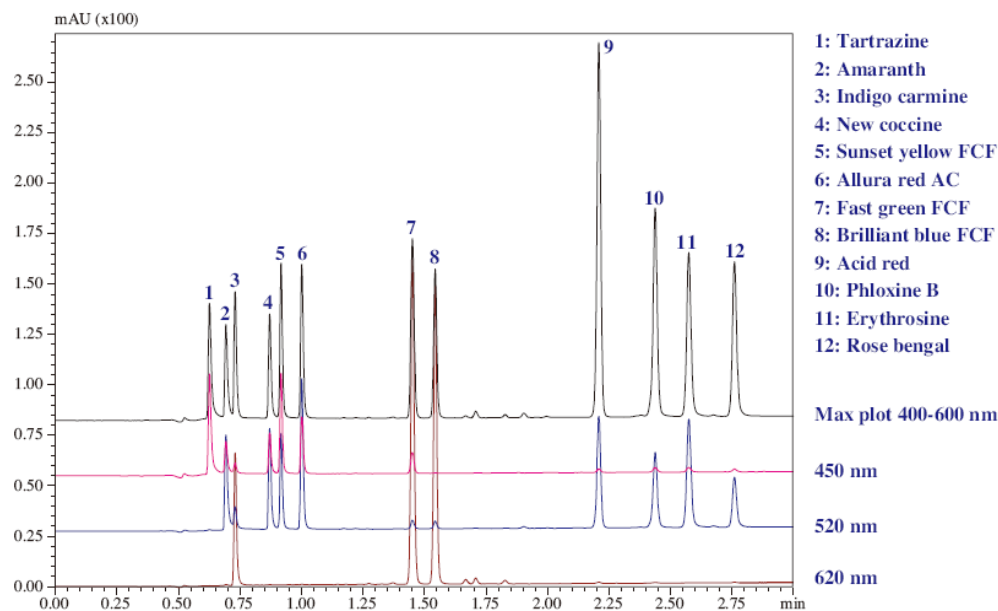


Fig.2 : Representative PDA chromatograms for artificial colorings by UFLC.

Peak No.	Compound	Wavelength (nm)	Average of retention time(min) %RSD	Average of peak area %RSD
1	Tartrazine	450	0.626 0.101	43919 0.137
2	Amaranth	520	0.693 0.101	39058 0.142
3	Indigo carmine	620	0.730 0.065	47560 0.128
4	New coccine	520	0.87 0.078	37763 0.086
5	Sunset yellow FCF	450	0.916 0.074	36241 0.148
6	Allura red AC	520	1.001 0.057	56083 0.135
7	Fast green FCF	620	1.45 0.073	154295 0.100
8	Brilliant blue FCF	620	1.543 0.064	135981 0.107
9	Acid red	520	2.209 0.037	60262 0.100
10	Phloxine B	520	2.438 0.035	45077 0.125
11	Erythrosine	520	2.574 0.025	69000 0.140
12	Rose bengal	520	2.760 0.024	31176 0.109

Table 1 : Repeatability of retention time, peak area (n=10, UFLC-PDA)

3) UFLC-ESI/QIT/TOFMS测定, 分析时间为9min (Fig. 3, 4)。

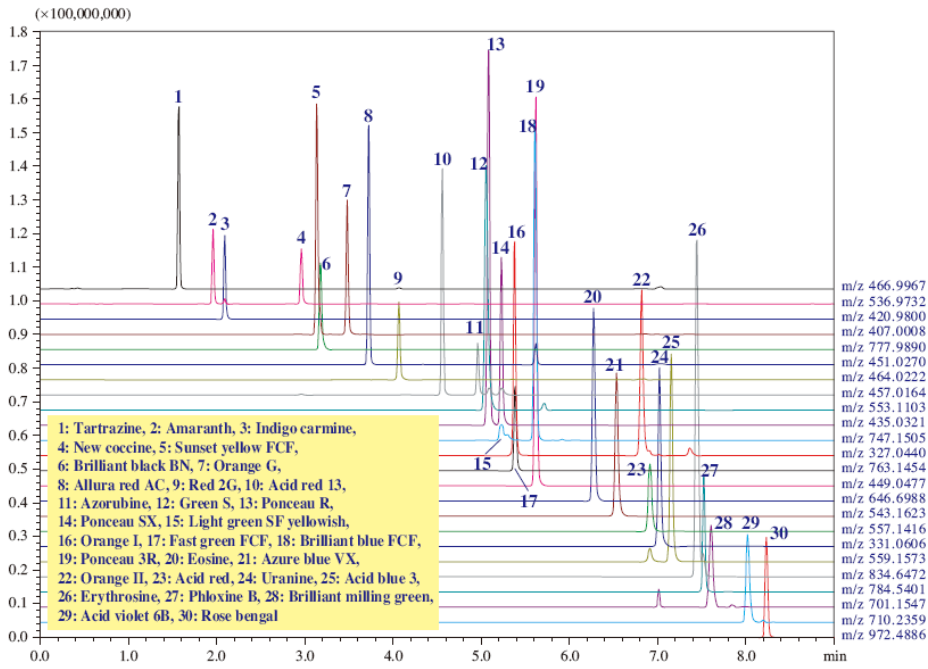


Fig. 3 : Representative mass chromatograms for artificial colorings (negative ion mode).

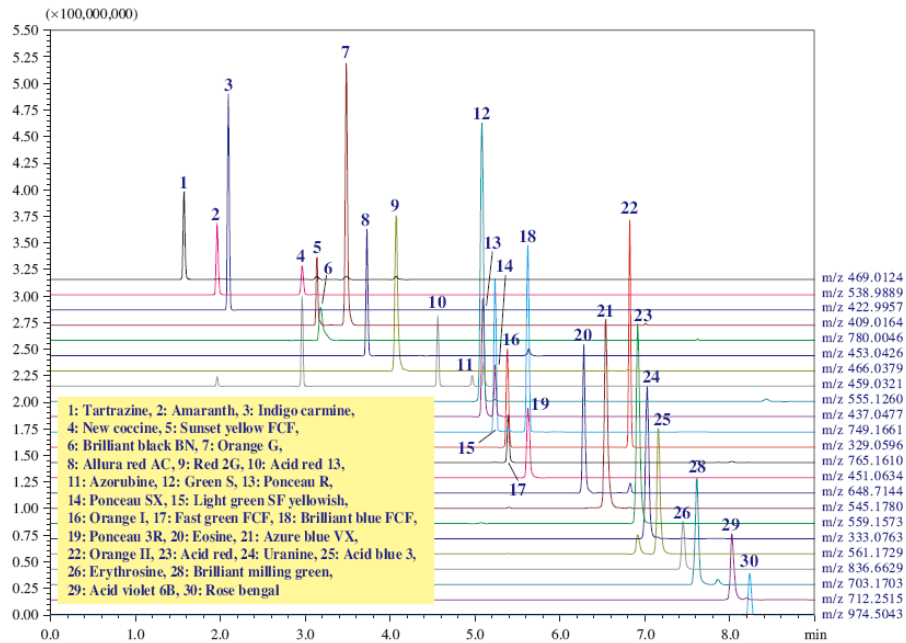


Fig. 4 : Representative mass chromatograms for artificial colorings (positive ion mode).

- 4) 使用外标校正TOF后，以自动极性转换方式进行精密质量测定，结果在两种极性下所有成分的误差在10ppm以下（Table 2, 3）。以不同颜色表示精密质量相同的化合物。

Peak No.	RT (min)	Compound	Exact mass	m/z , theoretical	m/z , measured	Error (ppm)
1	1.566	Tartrazine	468.00457	466.99674	466.9984	3.55
2	1.955	Amaranth	537.98106	536.97323	536.9742	1.81
3	2.086	Indigo carmine	421.98786	420.98003	420.9776	-5.77
4	2.964	New cocchine	537.98106	536.97323	536.9738	1.06
5	3.135	Sunset yellow FCF	408.00859	407.00076	407.0013	1.33
6	3.175	Brilliant black BN	778.99679	777.98896	777.9902	1.59
7	3.483	Orange G	408.00859	407.00076	407.0010	0.59
8	3.720	Allura red AC	452.03481	451.02698	451.0264	-1.29
9	4.063	Red 2G	465.03006	464.02223	464.0235	2.74
10	4.558	Acid red 13	458.02424	457.01641	457.0175	2.39
11	4.960	Azorubine	458.02424	457.01641	457.0182	3.92
12	5.020	Green S	554.11814	553.11031	553.1119	2.87
13	5.086	Ponceau R	436.03989	435.03206	435.0329	1.93
14	5.222	Ponceau SX	436.03989	435.03206	435.0322	0.32
15	5.234	Light green SF yellowish	748.15829	747.15046	747.1536	4.20
16	5.373	Orange I	328.05178	327.04395	327.0451	3.52
17	5.388	Fast green FCF	764.15321	763.14538	763.1489	4.61
18	5.605	Brilliant blue FCF	748.15829	747.15046	747.1513	1.12
19	5.615	Ponceau 3R	450.05554	449.04771	449.0482	1.09
*20	6.271	Eosine	643.71052	646.69880	646.6993	0.77
21	6.528	Azure blue VX	544.17018	543.16235	543.1639	2.85
22	6.816	Orange II	328.05178	327.04395	327.0446	1.99
23	6.917	Acid red	558.14944	557.14161	557.1439	4.11
24	7.023	Uranine	332.06847	331.06064	331.0587	-5.86
25	7.154	Acid blue 3	560.16509	559.15726	559.1564	-1.54
26	7.446	Erythrosine	835.65507	834.64724	834.6509	4.39
*27	7.527	Phloxine B	779.55463	784.54010	784.5460	7.52
28	7.608	Brilliant milling green	702.16250	701.15467	701.1558	1.61
29	8.021	Acid violet 6B	711.24368	710.23585	710.2393	4.86
*30	8.233	Rose bengal	971.49917	972.48860	972.4954	6.99

*: most abundant ion was chosen.

Table 2 : Accurate mass measurement (negative ion mode)

Peak No.	RT (min)	Compound	Exact mass	m/z , theoretical	m/z , measured	Error (ppm)
1	1.566	Tartrazine	468.00457	469.01240	469.0119	-1.07
2	1.955	Amaranth	537.98106	538.98889	538.9875	-2.58
3	2.086	Indigo carmine	421.98786	422.99569	422.9963	1.44
4	2.964	New cocchine	537.98106	538.98889	538.9900	2.06
5	3.135	Sunset yellow FCF	408.00859	409.01642	409.0163	-0.29
6	3.175	Brilliant black BN	778.99679	780.00642	780.0064	2.28
7	3.483	Orange G	408.00859	409.01642	409.0164	-0.05
8	3.720	Allura red AC	452.03481	453.04264	453.0417	-2.07
9	4.063	Red 2G	465.03006	466.03789	466.0398	4.10
10	4.558	Acid red 13	458.02424	459.03207	459.0318	-0.59
11	4.960	Azorubine	458.02424	459.03207	459.0314	-1.46
12	5.020	Green S	554.11814	555.12597	555.1253	-1.21
13	5.086	Ponceau R	436.03989	437.04772	437.0497	4.53
14	5.222	Ponceau SX	436.03989	437.04772	437.0505	6.36
15	5.234	Light green SF yellowish	748.15829	749.16612	749.1695	4.51
16	5.373	Orange I	328.05178	329.05961	329.0614	5.44
17	5.388	Fast green FCF	764.15321	765.16104	765.1663	6.87
18	5.605	Brilliant blue FCF	748.15829	749.16612	749.1703	5.58
19	5.615	Ponceau 3R	450.05554	451.06337	451.0622	-2.59
*20	6.271	Eosine	643.71052	648.71440	648.7208	9.87
21	6.528	Azure blue VX	544.17018	545.17801	545.1780	-0.02
22	6.816	Orange II	328.05178	329.05961	329.0598	0.58
23	6.917	Acid red	558.14944	559.15727	559.1580	1.31
24	7.023	Uranine	332.06847	333.07630	333.0764	0.30
25	7.154	Acid blue 3	560.16509	561.17292	561.1725	-0.75
26	7.446	Erythrosine	835.65507	836.66290	836.6690	7.29
*27	7.527	Phloxine B	779.55463	786.55570	N.D.	N.D.
28	7.608	Brilliant milling green	702.16250	703.17033	703.1758	7.78
29	8.021	Acid violet 6B	711.24368	712.25151	712.2563	6.73
*30	8.233	Rose bengal	971.49917	974.50430	974.5084	4.21

*: most abundant ion was chosen. N.D: not detected.

Table 3 : Accurate mass measurement (positive ion mode)

5) Fig. 5表示组成推断结果例。利用同位素模式、氮规则、MS/MS测定的碎片离子信息等，获得了高分。

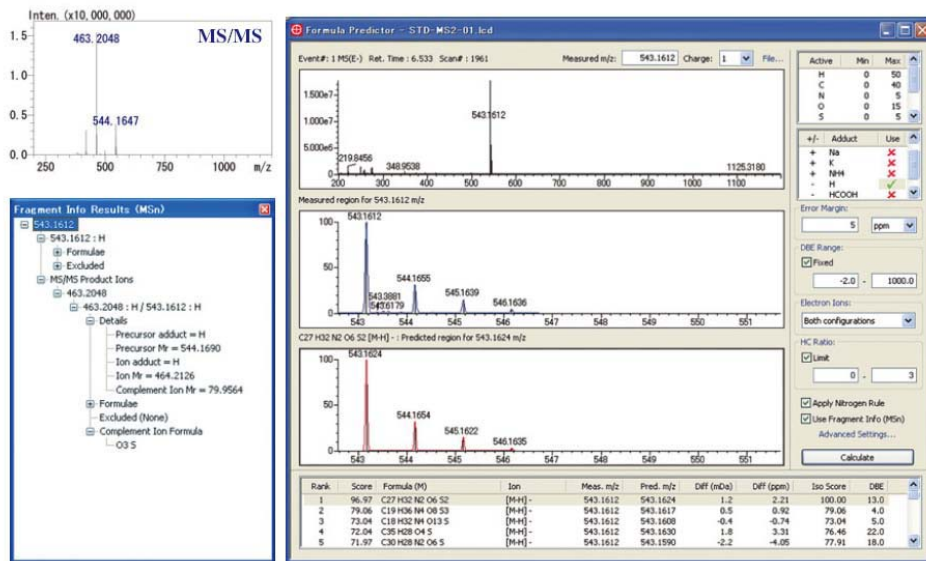


Fig.5 : Results of formula prediction for Azure blue VX (MS/MS).

4. 结论

使用ProminenceUFLC进行合成色素的快速分析, 可将分析时间缩短至常规分析的1/6, 并获得了良好的重现性。显示出QIT/TOFMS精密质量测定、MS/MS测定可实现可靠的成分定性, 同时通过进行自动极性转换, 将分析时间缩短了一半。



LCMS-IT-TOF LIQUID CHROMATOGRAPH MASS SPECTROMETER

装置配置 : QIT-TOF
质量范围 : m/z 50-5000 (MS方式) · m/z 50-3000 (MS_n 方式)
MSⁿ能力 : N=10
分辨率 (FWHM) : Over 10000@ m/z 1000
质量精度 : 5ppm (内标)
测定速度 : 10 spectra/sec
极性转换速度 : 100msec