

Agilent 1290 Infinity UHPLC 在环境分析中的应用： 色谱发展

应用简报

环境

作者

E. Michael Thurman 和 Imma Ferrer
环境质谱中心
环境工程系
科罗拉多大学
博尔德分校，科罗拉多州，美国

摘要

本文说明了采用新型 Agilent 1290 Infinity LC 在环境应用中进行 UHPLC（超高压液相色谱）分析的实例。这些实例包括采用 EPA 1694 方法和 UHPLC 分析废水中的药物残留，使方法更加高效和可靠。第二个展示的实例是采用快速色谱分析复杂的农药混合物，为许多 UHPLC 环境分析应用开启了新的方向。最后，我们展示了一个使用 UHPLC 和超快速梯度在 60 秒内完成的废水中药物残留的分析，这是第一个将该方法应用于环境分析的实例之一。本文还对高效 UHPLC 分析的理解进行了讨论和说明。



Agilent Technologies

前言

UHPLC 的问世给液相色谱/质谱 (LC/MS) 分析带来了两个重要的革新。首先是 1.8 μm 填料色谱柱的使用, 与 5 μm 填料色谱柱相比, 塔板数提高了大约两倍。这对于具有复杂基质的环境分析应用来说非常重要, 如废水中的药物残留分析。当然, 1.8 μm 填料色谱柱的使用在常规条件下需要耐压超过 600 bar 的高压泵, 是 UHPLC 正常使用的压力范围。第二, 1.8 μm 填料色谱柱允许运行高分离度快速色谱, 甚至分析时间可能短于 1 min 的超快速色谱。这些分析需要的高流速所产生的压力在 800-1000 bar, 或更高, 处于 UHPLC 的压力范围。

在短时间内实现高样品通量的需求已导致产生了使用 1.8 μm 反相填料色谱柱的高效、快速液相色谱。对于那些每天需要分析数百个样品, 或需要快速分析的实验室, 必须拥有快速色谱。使用快速分离液相色谱, 可以在几小时而非几天内报告一批样品的分析结果。在水质检测和食品分析行业, 法规监管实验室在不到 1 小时内就可以给出有效的结果, 那么在检测或给出分析结果的同一天, 就可以进一步进行相应水处理或准予蔬菜装运。最终的结果是, 对于用户来说更高效, 对于出具报告的实验室来说也更节省费用。因此, 通过缩短分析时间可以提高分析效率, 这通常需要使用 UHPLC。高分离度快速液相色谱的定义很简单, 短于 10 min 的液相色谱分离可谓快速, 而短于 1 min 的分离通常称为超快速 [1]。

另外, 当使用更长的 1.8 μm 填料色谱柱时, 运行 UHPLC 可以得到更高的峰容量。现在有可能实现高近 300 倍的峰容量, 这对于废水中未知物的分析, 以及其它如农药筛选等环境分析应用非常有价值。最后, UHPLC 系统应该耐用, 并且可以在高压和高流速下 (在 1200 bar 压力下大于 1 mL/min) 实现快速分离和具有高峰容量的常规流速色谱。安捷伦提供专为耐受高达 1200 bar (18000 psi) 压力而设计的 1.8 μm 填料色谱柱, 并且具有多种

类型的固定相。(StableBond 和 ZORBAX Eclipse Plus 系列的 C8、C18 色谱柱)。这对于难于分析的水样很有用, 正如本文所示, 采用 EPA 方法 1694 进行废水中的药物残留分析时提高了峰容量。在采用三重四极杆质谱和液相色谱/飞行时间质谱进行药物和农药残留的快速分离分析时, 它们也非常有用。

实验部分

本文工作由位于美国科罗拉多州的科罗拉多大学博尔德分校环境质谱中心的 Imma Ferrer 和 Michael Thurman 博士完成。使用 Agilent 1290 Infinity LC 系统, 以及 Agilent 6430 三重四极杆 LC/MS 和 Agilent 6220 精确质量飞行时间 LC/MS 系统。

色谱柱

针对快速分离高通量 (RRHT) 分析, 测试了两种不同的色谱柱, 包括耐高压 (1000 bar) 的 1.8 μm 粒径色谱柱。表 1 列出了本工作中测试的这些色谱柱及其理论塔板数。

表 1. 本研究中采用的色谱柱

色谱柱	内径 (mm)	粒径 (μm)	理论塔板数 (N)	额定耐压 (bar)
ZORBAX Eclipse Plus-C18	2.1 \times 100	1.8	21688	1000
ZORBAX Eclipse Plus-C18	2.1 \times 50	1.8	10392	1000

色谱和质谱条件

本文所有 UHPLC 色谱分离都使用 Agilent 1290 Infinity 液相色谱仪, 同时, 在标准 EPA 方法 1694 运行中使用 Agilent 1200 系列 SL。本文中各张色谱图的分析条件如下所述。

图 1. A 部分

液相色谱仪为 Agilent 1200 系列 SL。梯度程序为 30 min 内从 10% 乙腈/水升到 100% 乙腈, 保持 5 min。流速是 0.6 mL/min。色谱柱为 ZORBAX Eclipse Plus-C18, 4.6 mm \times 150 mm, 3.5 μm 。峰宽为 15-18 s, 峰容量为 100。最高压力 75 bar。

质谱仪为 Agilent 6410 三重四极杆 LC/MS 系统, 采用电喷雾正离子模式, 使用三个时间段的多反应监测 (MRM) 检测模式。每个化合物有两个离子对, 每个离子对的驻留时间为 10 ms。化合物为 EPA 方法 1694 的第 1 组化合物。有关这些化合物及其离子对的更详细信息请参见我们的应用简报 [2]。

图 1. B 部分

液相色谱仪为 Agilent 1290 Infinity LC。梯度程序为 10 min 内从 10% 乙腈/水升到 100% 乙腈, 保持 1 min。流速是 0.6 mL/min。色谱柱为 ZORBAX Eclipse Plus-C18, 2.1 mm × 50 mm, 1.8 μm。峰宽为 5-6 秒, 峰容量为 100。最高压力 375 bar。

质谱仪为 Agilent 6430 三重四极杆 LC/MS 系统, 采用电喷雾正离子模式, 使用一个时间段的 MRM 检测模式。每个化合物有两个离子对, 每个离子对的驻留时间为 10 ms。化合物为 EPA 方法 1694 的第 1 组化合物。有关这些化合物及其离子对的更详细信息请参见我们的应用简报 [2]。

图 2

液相色谱仪为 Agilent 1290 Infinity LC。梯度程序为 20 min 内从 10% 乙腈/水升到 100% 乙腈, 保持 2 min。流速是 0.6 mL/min。色谱柱为 ZORBAX Eclipse Plus-C18, 2.1 mm × 100 mm, 1.8 μm。峰宽为 5-6 秒, 峰容量为 100。最高压力 750 bar。

质谱仪为 Agilent 6430 三重四极杆 LC/MS 系统, 采用电喷雾正离子模式, 使用一个时间段的 MRM 检测模式。每个化合物有一个离子对, 每个离子对的驻留时间为 10 ms。化合物为 EPA 方法 1694 的 1-4 组化合物, 另加入了 15 种药物。有关这些化合物及其离子对的更详细信息请参见我们的应用简报 [2]。

图 3A

液相色谱仪为 Agilent 1290 Infinity LC。梯度程序为 2 min 内从 10% 乙腈/水升到 100% 乙腈, 无保持时间。流速是 1.2 mL/min。色谱柱为 ZORBAX Eclipse Plus-C18, 2.1 mm × 50 mm, 1.8 μm。峰宽为 1-3 秒, 峰容量为 60。最高压力 780 bar。

质谱仪为 Agilent 6430 三重四极杆 LC/MS 系统, 采用电喷雾正离子模式, 使用两个时间段的 MRM 检测模式, 每个时间段六个化合物。每个化合物有一个离子对, 每个离子对的驻留时间为 5 ms。化合物为从 EPA 方法 1694 中选择的 12 个化合物。

图 3B

液相色谱仪为 Agilent 1290 Infinity LC。梯度程序为 2 min 内从 10% 乙腈/水升到 100% 乙腈, 没有保持时间。流速是 1.2 mL/min。色谱柱为 ZORBAX Eclipse Plus-C18, 2.1 mm × 50 mm, 1.8 μm。峰宽为 1-3 秒, 峰容量为 60。最高压力 780 bar。

质谱仪为 Agilent 6430 三重四极杆 LC/MS 系统, 采用电喷雾正离子模式, 使用两个时间段的 MRM 检测模式, 每个时间段三个化合物。每个化合物有一个离子对, 每个离子对的驻留时间为 5 ms。化合物为 EPA 方法 1694 中的卡马西平、可替宁、咖啡因、苯海拉明、噻苯达唑和甲氧苄啶。

图 4 和 5

液相色谱仪为 Agilent 1290 Infinity LC。梯度程序为 2 min 内从 10% 乙腈/水升到 100% 乙腈, 没有保持时间。流速是 1.5 mL/min。色谱柱为 ZORBAX Eclipse Plus-C18, 2.1 mm × 50 mm, 1.8 μm。峰宽为 1-3 秒, 峰容量为 60。最高压力 900 bar。

质谱仪为 Agilent 6520 精确质量 Q-TOF LC/MS 系统, 采用电喷雾正离子模式, 采用每秒扫描 20 次的 2 GHz 采集频率, 质量准确度高于 2 ppm。化合物包括 Thurman 等 (2008) 报告列表中的 220 种农药的混合物。

图 6

液相色谱仪为 Agilent 1290 Infinity LC。梯度程序为 2 min 内从 10% 乙腈/水升到 100% 乙腈, 没有保持时间。流速是 1.2 mL/min。色谱柱为 ZORBAX Eclipse Plus-C18, 2.1 mm × 50 mm, 1.8 μm。峰宽随质谱仪每秒扫描次数的不同而不同。最高压力 780 bar。

质谱仪 Agilent 6430 三重四极杆 LC/MS 系统，为采用电喷雾正离子模式，使用一个时间段的 MRM 检测模式，每个时间段一个化合物，即卡马西平。每个化合物有一个离子对，驻留时间范围 1-300 ms，对应每秒 3-20 多次的扫描。

图 7

液相色谱仪为 Agilent 1290 Infinity LC。梯度程序分别为在 2、6 和 30 min 内从 10% 乙腈/水升到 100% 乙腈，没有保持时间。流速是 0.6 mL/min。色谱柱为 ZORBAX Eclipse Plus-C18，2.1 mm × 100 mm，1.8 μm。峰宽为 2-6 秒，峰容量为 60。最高压力 750 bar。

质谱仪为 Agilent 6430 三重四极杆 LC/MS 系统，采用电喷雾正离子模式，使用一个时间段的 MRM 检测模式，每个时间段一个化合物，即咖啡因。每个化合物有一个离子对，驻留时间 5 ms。

样品制备

药物分析标准品购自 Sigma 公司（圣路易斯，密苏里州，美国）。每种药物贮备液（约 1000 g/mL）根据化合物的溶解性采用纯乙腈或甲醇制备，并于 -18 °C 下保存。取这些溶液适量，用乙腈和水稀释制备工作标准溶液。

农药分析标准品购自 Dr. Ehrenstorfer 公司（奥格斯堡，德国）。每种农药贮备液（1000 g/mL）根据化合物的溶解性采用纯乙腈或甲醇制备，并于 -18 °C 下保存。取这些高浓度的溶液适量，用乙腈和水稀释制备工作标准溶液。

废水样品采自博尔德河（博尔德，科罗拉多州）的一个污水排放点，采用一个修订的 EPA 方法中的聚合物小柱进行提取。取 1 升水样直接采用含 500 mg 吸附剂的小柱进行提取，来调节 pH 值，于空气中干燥 10 分钟后，用 8 mL 甲醇进行洗脱。将甲醇洗脱液蒸发至 1 mL，并且采用下述的 LC/MS/MS 方法进行分析。为进行方法验证，采用“空白”废水提取物制备基质匹配的标准样品。采用不同浓度的药物混合物对废水提取物进行加标（范围为 0.1-500 ppb），然后采用 LC/MS/MS 进行分析。

结果与讨论

本文包括三个部分，分别讨论采用 EPA 方法 1694 快速分离废水中的药物残留及峰容量，农药残留的 UHPLC 和 LC/TOF-MS 分析，以及使用 UHPLC/MS 时有关色谱的一些重要注意事项。

第 1 部分：采用 LC/MS/MS 法进行环境药物残留分析

EPA 方法 1694 是一个标准方法，它需要用 20 分钟或更长的分析时间来满足方法的要求。然而，EPA 最近发布的一些变化提示，如果使用了充分的质谱分析（例如每个化合物有两个离子对），就可以使用其它色谱条件，如更短的分析时间和快速分离。图 1 展示了采用新型的 Agilent 1290 Infinity 和 UHPLC 进行分析，后者将分析时间由前者的 30 min 缩短到 10 min，分析时间缩短了 66%，两种方法的峰容量均为 100。原始的 EPA 方法要求使用 ZORBAX Eclipse Plus-C18，3.5 μm 填料色谱柱，而快速分离方法则使用 ZORBAX Eclipse Plus-C18，2.1 mm × 50 mm，1.8 μm 填料色谱柱。

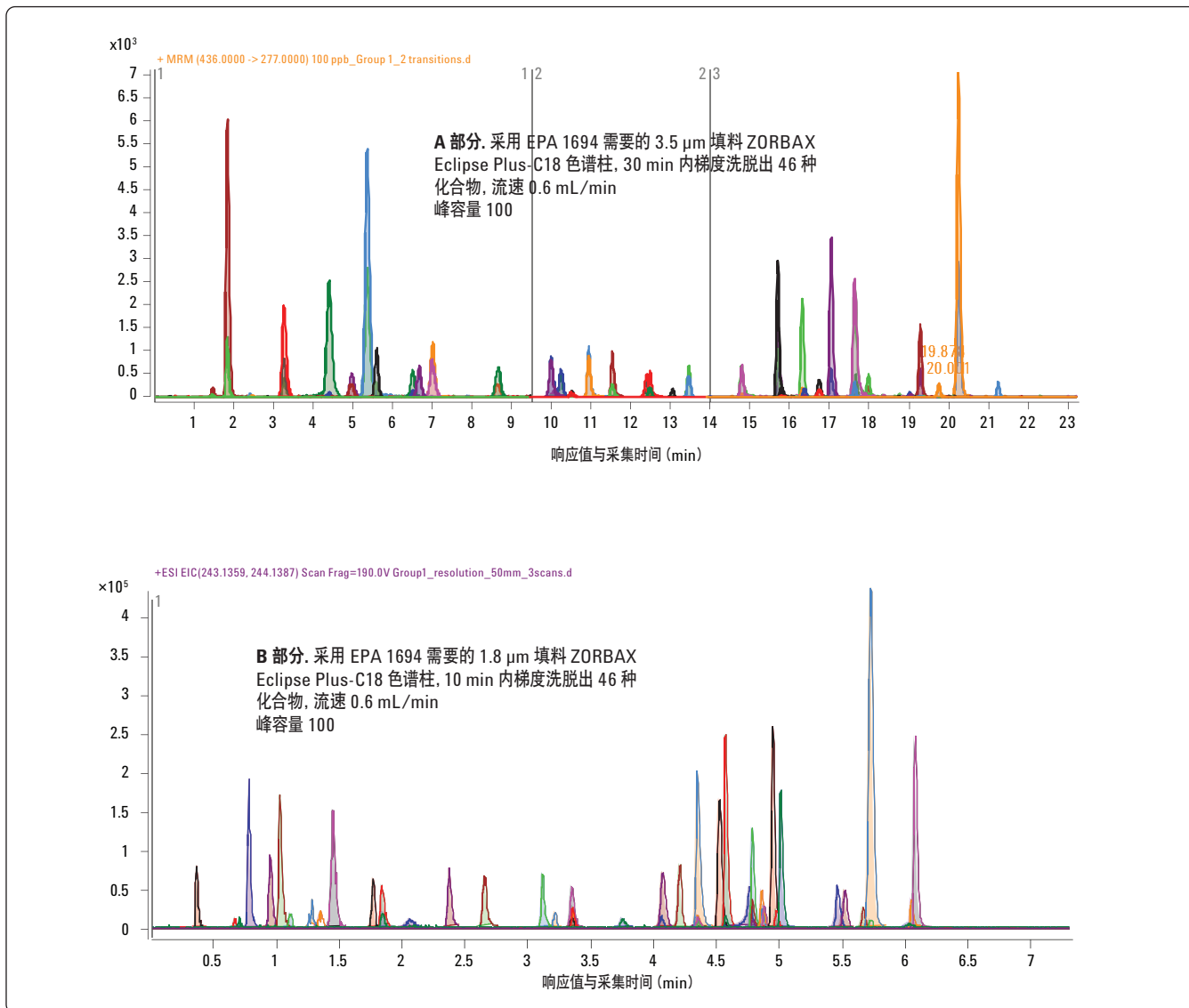


图 1. 采用 Agilent 1290 Infinity 及 UHPLC 对 EPA 方法 1694 第 1 组中的药物进行分析, 分析时间由 30 min 缩短到 10 分钟

因为压力仅有 375 bar, 这就能够很容易通过使用更长的色谱柱 (2.1 mm x 100 mm) 来提高峰容量和可能需要分离药物的数量, 并保持 0.6 mL/min 的相同流速。但这会使压力加倍, 由 375 bar 上升到 750 bar。结果见图 2。

还可以通过使用 Agilent 1290 Infinity LC 和三重四极杆质谱联用的 LC/MS 方法, 实现药物的超快色谱分离。如图 3 的示例, 为了获得每个色谱峰完成至少 20 次扫描, 化合物的数量减少到 12 个。

通过实现 20 或更多次扫描, 峰宽可以减小到 1-2 秒, 从而实现了超快速色谱分离。采用 ZORBAX Eclipse Plus C18, 2.1 mm x 50 mm 色谱柱, 流速 1.2 mL/min, 梯度洗脱时间为 1.5 min。12 种药物在 60 秒内完成洗脱。据我们了解, 这应是第一例环境样品的超快速色谱分析。本例中, 采自科罗拉多州博尔德的废水样品包含下列药物: 卡马西平、可替宁、咖啡因、苯海拉明、噻苯达唑和甲氧苄啶。

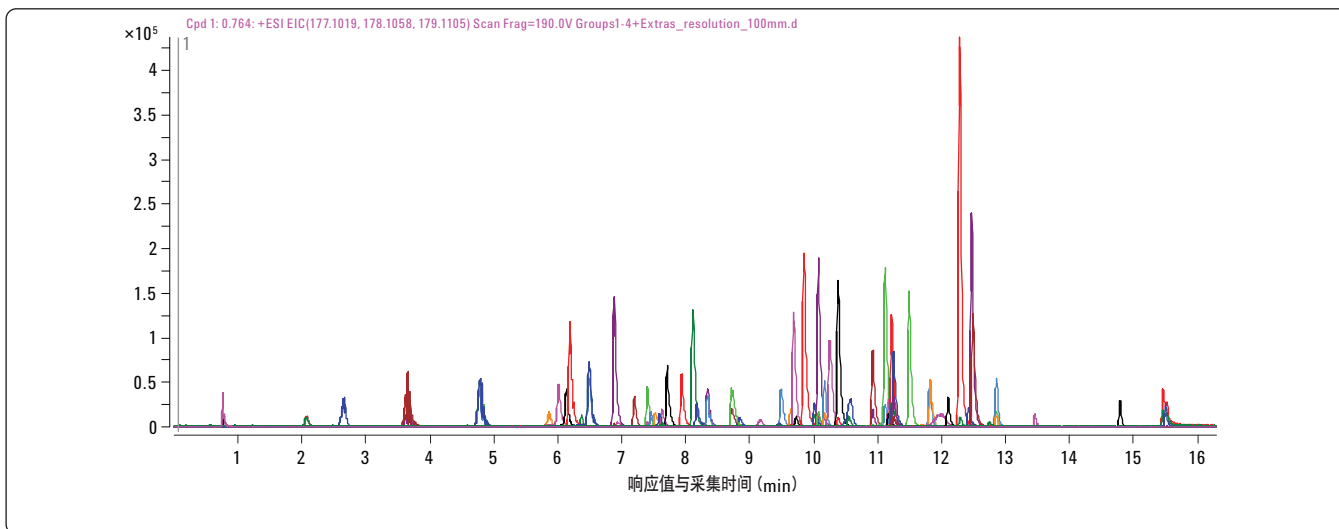


图 2. 使用配备 ZORBAX Eclipse Plus C18, 2.1 mm × 100 mm, 1.8 μm 填料色谱柱的 Agilent 1290 Infinity LC 进行 UHPLC 分析, 峰容量的提高可在 20 分钟内实现 EPA 方法 1694 所列药物加上另外 15 种新化合物总共 90 种药物的分离。峰宽有 5-6 秒, 峰容量为 200

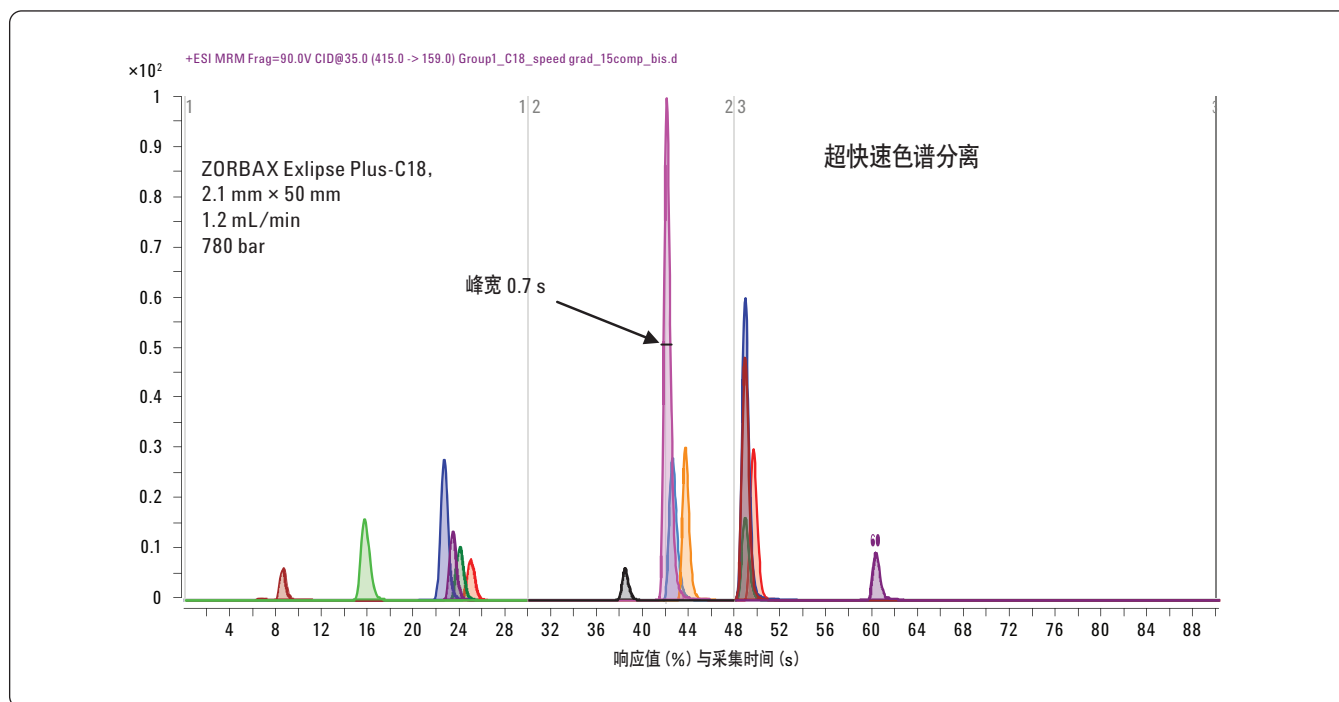


图 3A. 12 种药物标准品的“超快速”梯度洗脱

我们应该充分认识到，当使用超快速梯度条件时，要求质量准确性和质量控制数据。因此，所有样品的纯度测量必须在样品制备过程中进行，以使离子抑制作用最小化。还有必要使用标记的内标进行定量分析，因为所有样品基质会在很窄的时间窗内流出。1290 Infinity 的重现性在 1 秒之内，这就能使我们非常容易地获得可靠的数据。另一个重要的事情是采用 LC/MS/MS 分析时至少要使用两个离子对，一个用于定量，另一个作为定性离子。请参见我们有关 EPA 方法更多实例的应用简报 [2]。

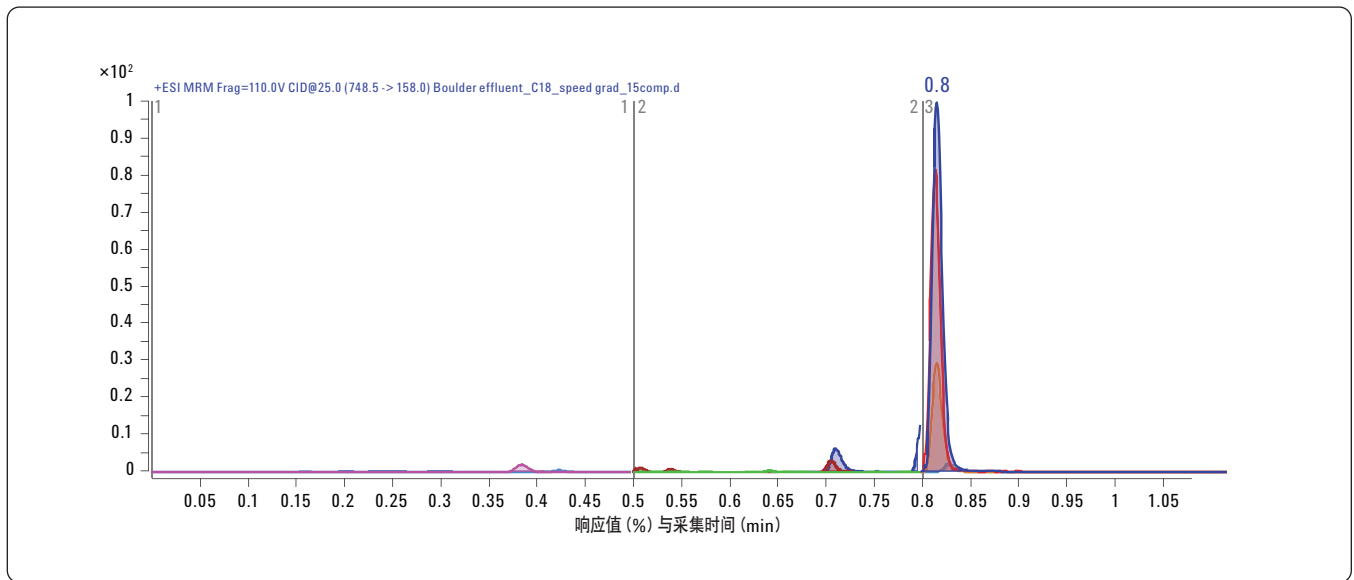


图 3B. 从美国科罗拉多州博尔德所采集的废水样品的超快速梯度洗脱。检测到的化合物包括：卡马西平、可替宁、咖啡因、苯海拉明、噻苯达唑和甲氧苄啶

第 2 部分：UHPLC 与 LC/TOF/MS

我们运行快速分离时要密切关注的事项之一，就是采用质谱对峰宽 1-2 秒的很窄的峰实现良好的数据采集。在上一例中，我们展示了采用三重四极杆 LC/MS 如何实现这一目的，并且保持每个峰扫描 20 次。采用 LC/TOF-MS 和 LC/Q-TOF-MS 使完成这项任务变得容易，因为监测多种化合物就像监测一个一样。这是由于 TOF-MS 仪器总是以全谱的模式采集数据。这只需要设置软件

让 TOF-MS 仪器每秒采集 20 张谱图即可。图 4 展示了当采用 LC/TOF-MS 或 LC/Q-TOF-MS 进行 UHPLC 分析时，该策略是多么高效。采用配备 ZORBAX Eclipse Plus C18, 2.1 mm × 50 mm 色谱柱的 Agilent 1290 Infinity LC, 流速 1.5 mL/min 时，100 多种农药在 80 秒内完成分析。UHPLC 分析要求系统耐压达到 900 bar。分离获得的半峰宽仅有 0.7 秒。见图 5 除草剂特丁净的例子。

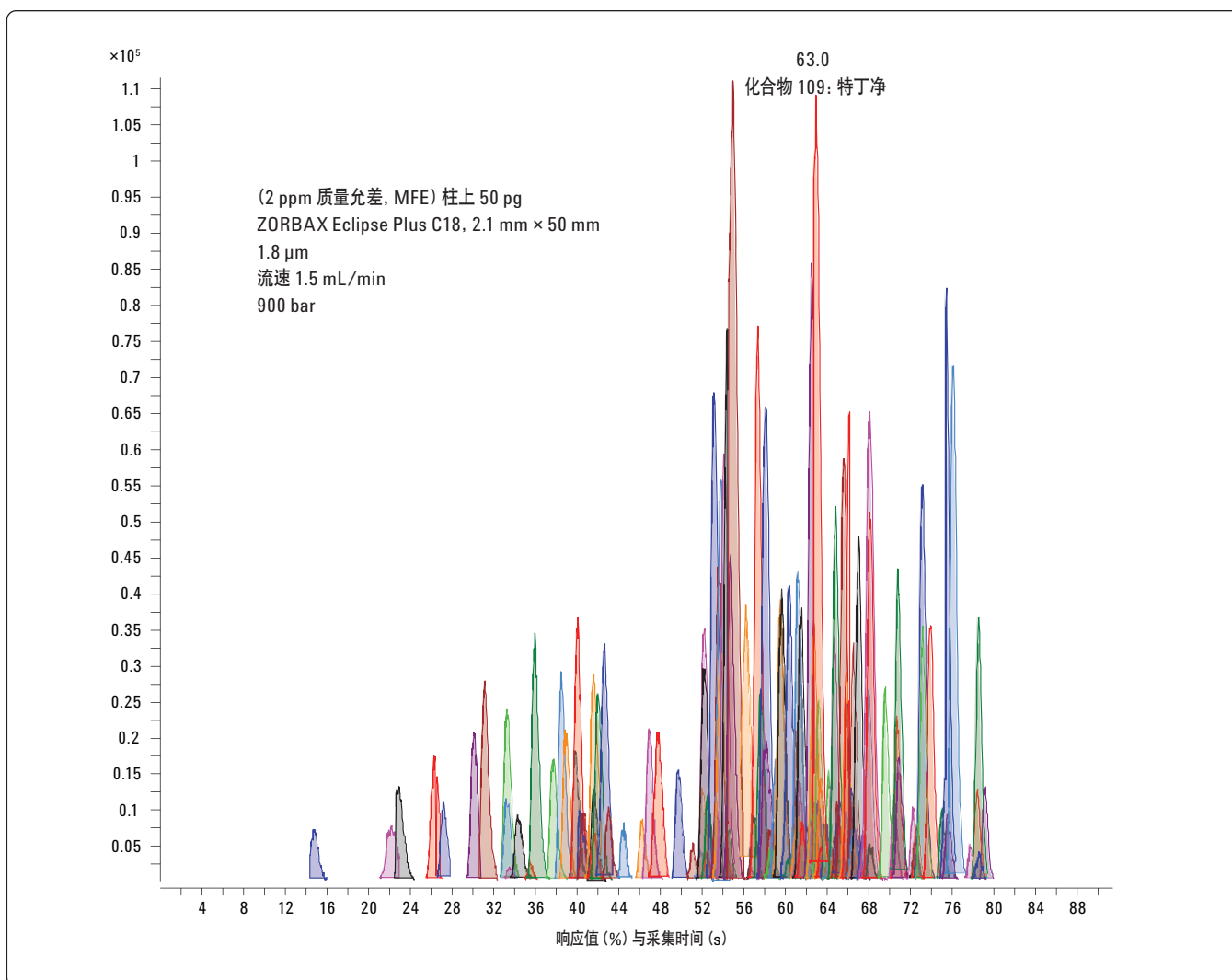


图 4. 采用 LC/TOF-MS 在不到 2 min 内实现超过 100 种化合物的农药分析

色谱分析的速度、分离度和 LC/TOF-MS 的强大功能，可实现在数分钟内对食品或水基质中复杂农药混合物的分析。这可以实现欧洲食品检测行业要求的快速分析，在欧洲，只有对运输的蔬菜和水果完成分析，方能卸货。因此，快速分析在这些情况下就显得非常重要。

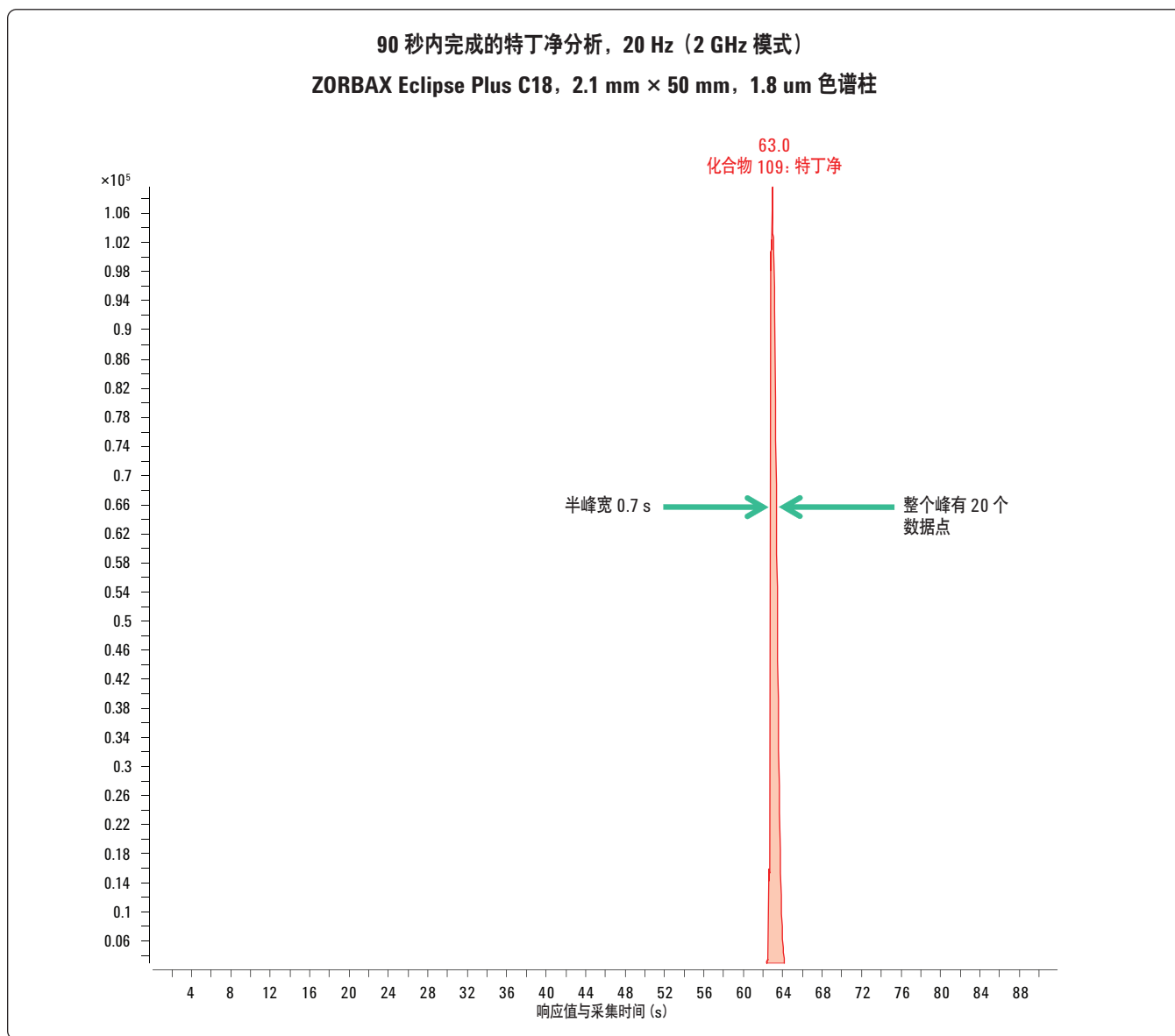


图 5. 半峰宽 0.7 s, 使用配置 ZORBAX Eclipse Plus C18, 2.1 mm × 50 mm 色谱柱的 Agilent 1290 Infinity 液相色谱仪, 流速 1.5 mL/min, 压力 900 bar

第 3 部分：UHPLC/MS 的色谱条件

为使 UHPLC 发挥最佳效能而优化色谱和质谱条件，需注意以下几点。首先，要在超快速色谱分析中获得 1-2 秒的峰宽，每个色谱峰包含至少 20 个 MS 数据点非常重要。每秒的采集多少数据的重要性见图 6 示例。

较低的循环率会导致峰展宽，这是由于为了实现良好的积分和定量，就要通过平滑处理调整色谱峰形状，这是所有色谱软件的一个常见的功能。所以，当使用三重四极杆 LC/MS 时，我们推荐使用 5 ms 的短驻留时间和动态 MRM 程序，以确保实现每个峰的 20 个数据采集周期。在使用 LC/TOF-MS 和 LC/Q-TOF-MS 的情况下，只需要对软件进行设置，即可实现在整个质量范围内每秒 20 张谱图的采集。

第二，UHPLC 的良好运行也需要考虑其定量分析方面的问题。在此分析中，获得最高的峰检测灵敏度就显得尤为重要。图 7 显示了一个通过不断调整梯度程序和流速，使咖啡因获得最大峰强度

和峰面积的实例。在本例中，运行一个 6 分钟的梯度程序，在保留时间 1.7 分钟处得到了最佳的信噪比 (S/N) 180 和 55000 的峰面积。注意，当运行较长的 30 min 的梯度程序时，信噪比仅为 91，下降了一半，而保留时间仅增加了 0.2 min。因此，测试不同的流速和保留时间来优化信号强度非常重要，尤其是对于色谱分析中极性化合物和早流出的化合物。

对于实现良好 UHPLC 色谱分析最后要考虑的是 LC/MS 信号的抑制作用。以前我们提到但现在仍要强调的是，在快速和超快速分析中，标准品信号经常很少或没有抑制现象，这是因为标准品混合物具有很高的纯度。当然，真实的样品会表现出信号抑制。因此，通过稀释样品或者在提取步骤中净化样品来减少基质干扰就非常重要。最后，当检测废水和其它复杂基质样品中的药物残留时，使用氘代或 C13 标记的标准品就很有价值。这是 EPA 方法 1694 推荐的过程，读者也可以参考我们与这一主题相关的应用简报 [2]。

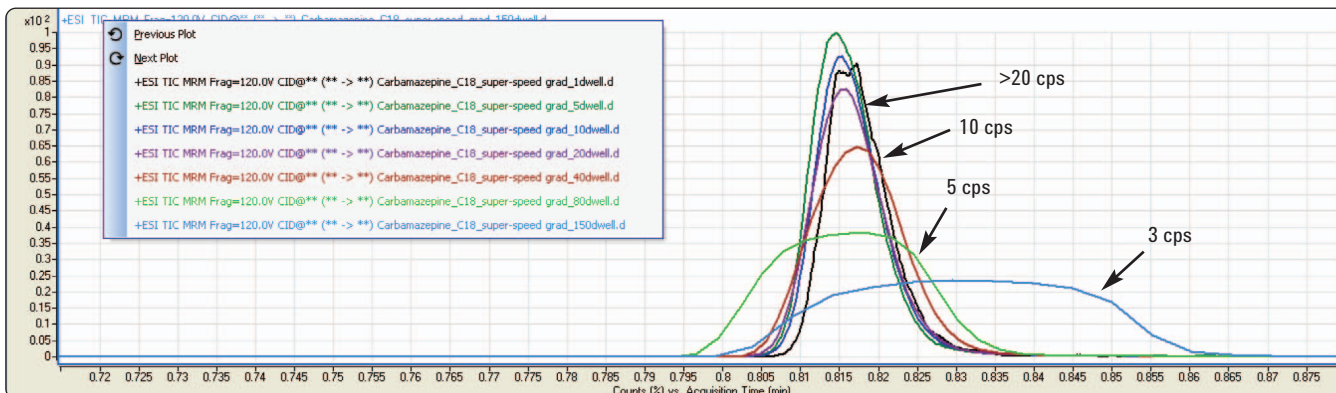


图 6. 本图显示了驻留时间和每个峰的数据点，以及它们如何影响单个化合物的色谱峰形状，以卡马西平为例，它从每秒 20 多次扫描 (cps) 得到的 1 s 的峰宽到每秒 3 次扫描 (cps) 得到的 3-4 s 的峰宽

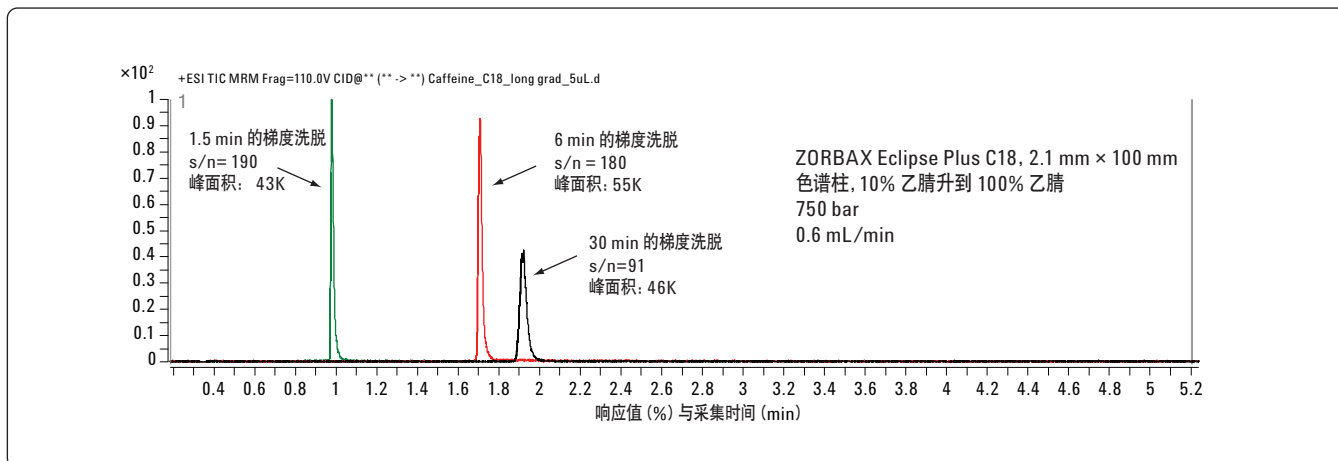


图 7. 咖啡因的 LC/MS 分析中，保留时间对信噪比 (S/N) 和峰面积的影响

结论

总之，我们推荐在快速分离和超快速色谱分离中使用 ZORBAX Eclipse Plus C18, 2.1 mm × 50 mm 色谱柱，而对于要获得最大的峰容量的分析，ZORBAX Eclipse Plus C18, 2.1 mm × 100 mm 色谱柱是较理想的选择。我们的分析结果显示，在流速高于 1.5 mL/min 的快流速和压力超过 1000 bar 时，我们仍可以得到值得信赖和可靠的结果。最后我们可以看到，从 Tsweet 的重力洗脱色谱柱，到目前“简便的”超快速高压液相色谱 UHPLC，新型的 Agilent 1290 Infinity LC 是当前色谱发展的最佳例证。

致谢

本环境质谱中心衷心感谢安捷伦有限公司的 Jerry Zweigenbaum、Michael Woodman 和 Peter Stone 博士所给予的帮助和建议。

参考文献

1. EPA Method 1694: Pharmaceuticals and personal care products in water, soil, sediment, and biosolids by HPLC/MS/MS (EPA 方法 1694: 使用 HPLC/MS/MS 检测水、土壤、沉积物和生物固体中的药物和个人护理用品)，2007 年 12 月，EPA-821-R-08-002.
2. I. Ferrer, E. M. Thurman, J. A. Zweigenbaum, “EPA 方法 1694: 使用 HPLC/MS/MS 检测水、土壤、沉积物和生物固体中的药物和个人护理用品的 Agilent 6410A LC/MS/MS 解决方案”，2008，应用技术，出版号 5989-9665CHCN
3. E. M. Thurman, I. Ferrer, J. A. Zweigenbaum, “Multi-Residue Analysis of 301 Pesticides in Food Samples by LC/Triple Quadrupole Mass Spectrometry.” (采用 LC/三重四极杆质谱对食物样品中的 301 种农药进行多残留分析) 2008，应用技术，出版号 5989-6414EN

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

安捷伦对本材料可能存在的错误，或由于提供、运行或使用本资料所造成的间接损失不承担任何责任。

本文中的信息、说明及技术指标如有变更，恕不另行通知。

© 安捷伦科技（中国）有限公司，2009
2009年8月18日，中国印刷
5990-4409CHCN



Agilent Technologies