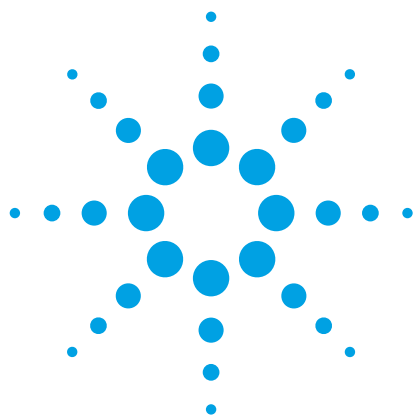




应用安捷伦 ZORBAX 超高压快速高分离度 HILIC Plus 色谱柱的 LC/MS/MS 测定不同进样溶剂对维生素 B 分析的影响

应用简报

食品检测与农业

作者

Anne E. Mack
安捷伦科技有限公司

摘要

Agilent 1290 Infinity 液相色谱与 Agilent 6410A 三重四极杆质谱联用系统上，采用安捷伦 ZORBAX 超高压快速高分离度 HILIC Plus 色谱柱对维生素 B 相关化合物（4-氨基苯甲酸、烟酰胺、维生素 B₂ 和烟酸）进行快速 LC/MS/MS 优化分析。以乙腈和醋酸铵缓冲液为流动相进行等度洗脱。应用此亲水作用色谱（HILIC），所有分析物峰形良好。然后用该方法论证在应用 HILIC 模式进行液相色谱分析时，选取合适溶剂的重要性。考察了包括水、乙腈、甲醇和混合溶剂等不同溶剂。其中，当纯乙腈作为溶剂时所有化合物的保留和峰形最佳，而水作溶剂时分析性能和峰形最差。



Agilent Technologies

前言

液相色谱法中 HILIC 的应用日渐盛行, 尤其用于传统反相液相色谱 (RPLC) 常难以分离的小极性分析物的保留和分离。这种新型的色谱模式由于使用水作为强洗脱溶剂而具有独特的保留机制, 同时高有机溶剂比例流动相的使用, 使此模式在样品制备和 LC/MS 检测灵敏度方面展现出超越传统 RPLC 的明显优势。高有机溶剂比例流动相不需要进样前干燥样品, 且较传统 RPLC 流动相有更高的挥发性, 这使得该技术非常适合于与质谱仪联用 [1]。

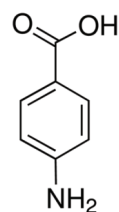
硅胶基色谱柱的 HILIC 保留涉及到多种机制的共同作用。首先, 水层必须吸附在极性硅胶表面, 形成液液萃取体系。从而极性分析物可在水层上进出分配, 且极性较大的分析物与水层固定相有更强的相互作用。带电的极性分析物也会与电离的硅胶发生离子交换。与 RPLC 正相反, 洗脱顺序通常是组极性从小到大。对于 HILIC 方法开发, 要谨记溶剂洗脱强度与 RPLC 中的不同。对于 HILIC 模式, 溶剂洗脱强度顺序为四氢呋喃 < 丙酮 < 乙腈 < 异丙醇 < 乙醇 < 甲醇 < 水, 水是最强的洗脱溶剂 [2、3、4]。

HILIC 广泛用于分析极性分子。本应用简报采用配有安捷伦 ZORBAX 超高压快速高分离度 HILIC 色谱柱的 LC/MS/MS 系统, 对 4 种维生素 B 相关化合物的分析进行优化。目标化合物为 4-氨基苯甲酸、烟酰胺、维生素 B₂ 和烟酸, 其结构见图 1。

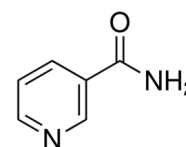
此外, 实验中需要重点关注的是 HILIC 性能对进样溶剂强度的敏感性。实验选取了 4 种维生素 B 相关化合物和一系列强度范围从 100% 乙腈至 100% 水的溶剂进行评价, 并讨论了溶剂效应对峰形和保留的影响。

实验部分

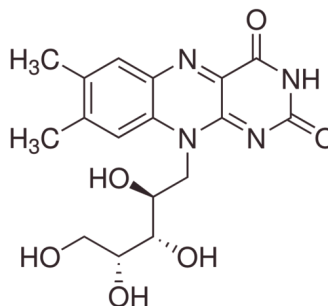
采用配有 Agilent 6410A 三重四极杆质谱的 Agilent 1290 Infinity 液相色谱系统。为了使柱外死体积尽可能小, 本实验采用安捷伦超低扩散工具包 (部件号 5067-5189) 中内径为 0.075 mm 的短毛细管和安捷伦液相色谱系统支架 (部件号 5001-3726) 进行安装优化 [5]。



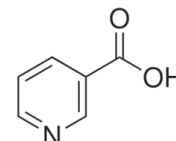
4-氨基苯甲酸
 $C_7H_7NO_2$
MW = 137.14



烟酰胺
 $C_6H_6N_2O$
MW = 122.12



维生素 B₂
 $C_{17}H_{20}N_4O_6$
MW = 376.36



烟酸
 $C_6H_5NO_2$
MW = 123.11

图 1. 维生素 B 相关化合物结构

实验条件

色谱柱:	Agilent ZORBAX 超高压快速高分离度 (RRHD) HILIC Plus 色谱柱, 2.1 × 50 mm, 1.8 μm (部件号 959757-901) 和 2.1 × 100 mm, 1.8 μm (部件号 959758-901)
流动相:	CH ₃ CN/100 mM NH ₄ HCO ₂ pH 3.2 (9:1)
流速:	0.4 mL/min、0.7 mL/min 或 1.0 mL/min, 等度洗脱
柱温:	25 °C
进样:	方法优化: 进样 0.1 μL 浓度均为 12.5 μg/mL 的 4-氨基苯甲酸、烟酰胺、维生素 B ₂ 和烟酸乙腈溶液 (最低含水量 < 5%) 进样溶剂比较: 进样 1 μL 浓度均为 5.7 μg/mL 的 4-氨基苯甲酸、烟酰胺、维生素 B ₂ 和烟酸的不同溶剂的溶液 (包括 H ₂ O、CH ₃ CN、CH ₃ OH 及其混合溶剂); 各分析物的结构见图 1
MS 离子源:	ESI+, 毛细管电压 4000 V, 干燥气温度、流速和雾化器压力依据流动相流速变化而定, 见表 1
MS 数据采集:	方法优化: 动态 MRM (dMRM), EMV 增益 200 V, MS 周期时间依据流动相流速变化而定, 见表 1, 各化合物 MRM transitions 见表 2 进样溶剂对比: 选择离子监测模式 (MS2, SIM), EMV 增益为 200 V, 驻留时间为 15 ms, 化合物依据表 2 中的母离子进行鉴定, 相应碎裂电压见表 2
软件:	分别采用 Agilent MassHunter B.03.01、B.02.00 和 B.03.01 版进行数据采集、定性和定量分析

4 种分析物 (粉末状) 均购于 Sigma Aldrich 公司, 并用不同溶剂配成适当浓度。乙腈和甲醇购于 Honeywell 公司。甲酸铵和甲酸购于 Sigma Aldrich 公司。实验用水为 18 MΩ Milli-Q 水。

表 1. 不同流速下最优的维生素分析质谱参数

	0.4 mL/min	0.7 mL/min	1.0 mL/min
离子源	ESI+	ESI+	ESI+
EMV 增益	200 V	200 V	200 V
MS 驻留时间	70 ms	50 ms	30 ms
干燥气温度	200 °C	200 °C	300 °C
干燥气流速	10 L/min	11 L/min	11 L/min
雾化器压力	30 psi	35 psi	55 psi
毛细管电压	4000 V	4000 V	4000 V

表 2. 最优维生素分析的质谱 MRM transitions

	母离子	碎裂电压	子离子	碰撞能量
4-氨基苯甲酸	138	110	120	15
	138	110	94	15
烟酰胺	123	130	80	25
	123	130	53	35
维生素 B ₂	377	160	243	30
	377	160	172	40
烟酸	124	130	80	20
	124	130	53	40

结果与讨论

图 2 为在不同流速下 4-氨基苯甲酸、烟酰胺、维生素 B₂ 和烟酸最优化的 LC/MS/MS 色谱图。应用 ZORBAX RRHD HILIC Plus 色谱柱分析，所有化合物均获得良好峰形和高柱效，且不受流动相流速影响。

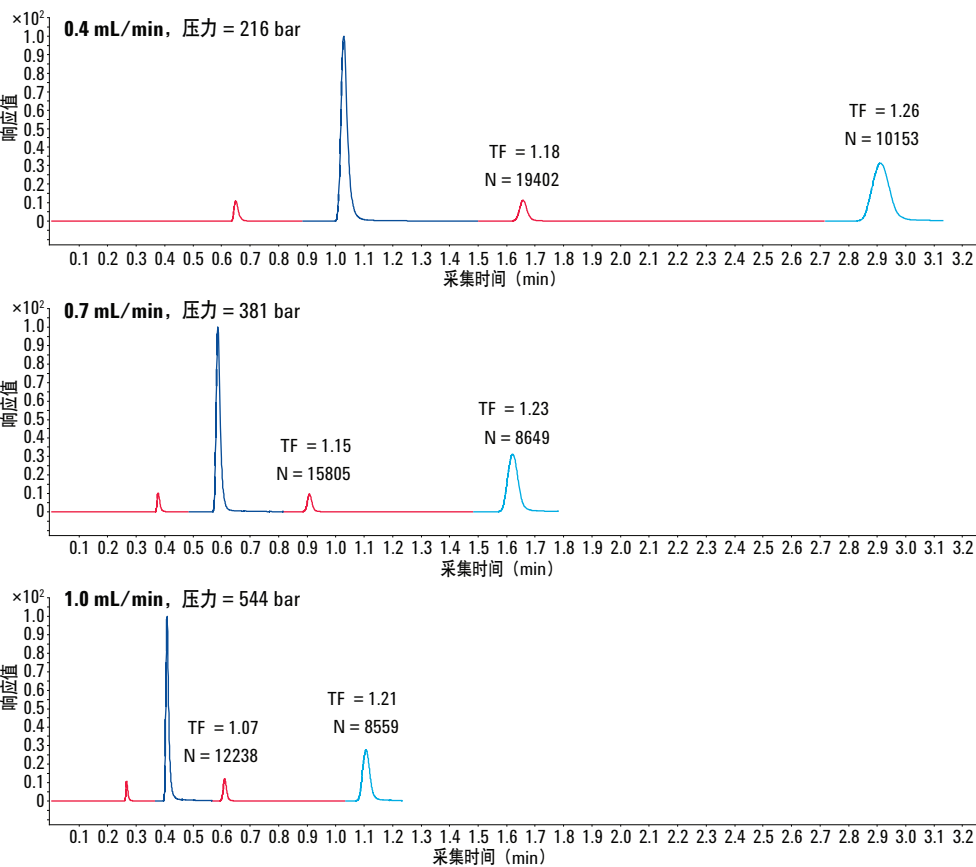


图 2. 采用 2.1 × 100 mm, 1.8 μm Agilent ZORBAX RRHD HILIC Plus 色谱柱和配有 Agilent 6410A 三重四极杆质谱的 Agilent 1290 Infinity 液相色谱系统，在不同流速下优化分析维生素 B 相关化合物的 LC/MS/MS 色谱图

系统:	配有 Agilent 6410A 三重四极杆质谱的 Agilent 1290 Infinity 液相色谱系统
色谱柱:	Agilent ZORBAX RRHD HILIC Plus, 2.1 × 100 mm, 1.8 μm (部件号 959758-901)
流动相:	CH ₃ CN/100 mM NH ₄ HCO ₂ pH 3.2 (9:1)
等度洗脱:	0.4 mL/min、0.7 mL/min 或 1.0 mL/min
进样:	进样 0.1 μL 浓度均为 12.5 μg/mL 的 4-氨基苯甲酸、烟酰胺、维生素 B ₂ 和烟酸的乙腈溶液
柱温箱温度:	25 °C
MS 离子源:	ESI+, 毛细管电压 4000 V, 干燥气温度、流速、雾化器压力和驻留时间见表 1
MS 数据采集:	dMRM 模式; 各化合物 transitions 见表 2

图 3A 和 3B 展现了 HILIC 模式下分析时进样强溶剂的影响。不同溶剂的各样品配制浓度相同。维生素 B 相关化合物乙腈储备溶液用不同混合溶剂按比例 1:10 稀释。进样溶剂为洗脱能力最强的水时，峰形严重扭曲，尤其是烟酰胺和维生素 B₂。烟酸由于被较长时间保留，因而受到的影响较出峰早的化合物小，但其保留时间发生了变化。虽然在 HILIC 模式下甲醇的洗脱强度不如水大，但它也影响了色谱性能。进样溶剂为 100% 至 50% 甲醇时比纯乙腈

样品溶液进样的峰展宽严重。在 HILIC 模式下分析，进样甲醇会使维生素 B₂ 和烟酸的保留下降。从这些进样溶剂的比较来看，很显然在 HILIC 模式下分析，样品溶剂洗脱强度越弱越好，即对于 HILIC 尽可能使用高比例乙腈（由分析物溶解度决定）。

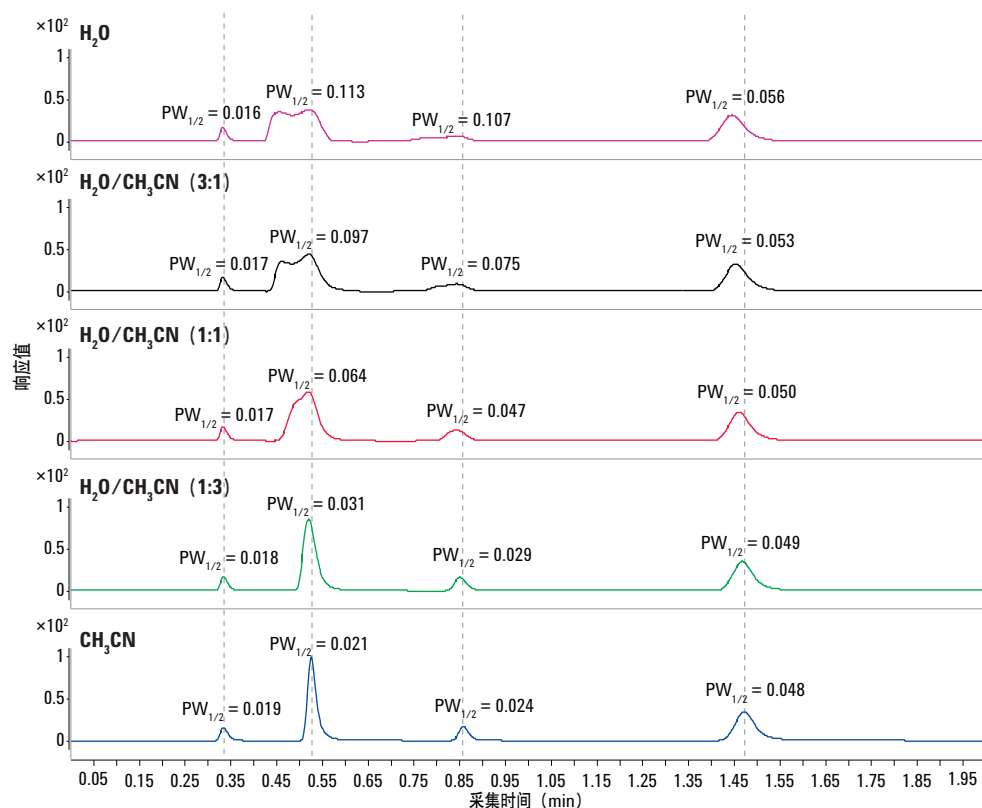


图 3A. 采用 2.1 x 50 mm, 1.8 μ m Agilent ZORBAX RRHD HILIC Plus 色谱柱和配有 Agilent 6410A 三重四极杆质谱的 Agilent 1290 Infinity 液相色谱系统探究进样溶剂对 HILIC/LC/MS 分析性能的影响。水 + 乙腈

系统: 配有 Agilent 6410A 三重四极杆质谱的 Agilent 1290 Infinity 液相色谱系统
 色谱柱: Agilent ZORBAX RRHD HILIC Plus, 2.1 x 50 mm, 1.8 μ m (部件号 959757-901)
 流动相: CH₃CN/100 mM NH₄HCO₂ pH 3.2 (9:1)
 等度洗脱: 0.4 mL/min, 压力 = 135 bar
 进样: 进样 1 μ L 浓度均为 5.7 μ g/mL 的 4-氨基苯甲酸、烟酰胺、维生素 B₂ 和烟酸不同溶剂的溶液
 柱温箱温度: 25 $^{\circ}$ C
 MS 离子源: ESI+, 毛细管电压: 4000 V, 干燥气: 200 $^{\circ}$ C, 10 L/min, 雾化器压力: 30 psi, 驻留时间: 15 ms
 MS 数据采集: MS2, SIM: m/z 138 (碎裂电压 110 V), m/z 123 (碎裂电压 130 V), m/z 377 (碎裂电压 160 V), m/z 124 (碎裂电压 130 V)
 样品制备: 准确量取 100 μ L 乙腈储备液, 用色谱图左边标示的溶剂将其稀释至 1 mL, 使各化合物最终浓度为 5.7 μ g/mL

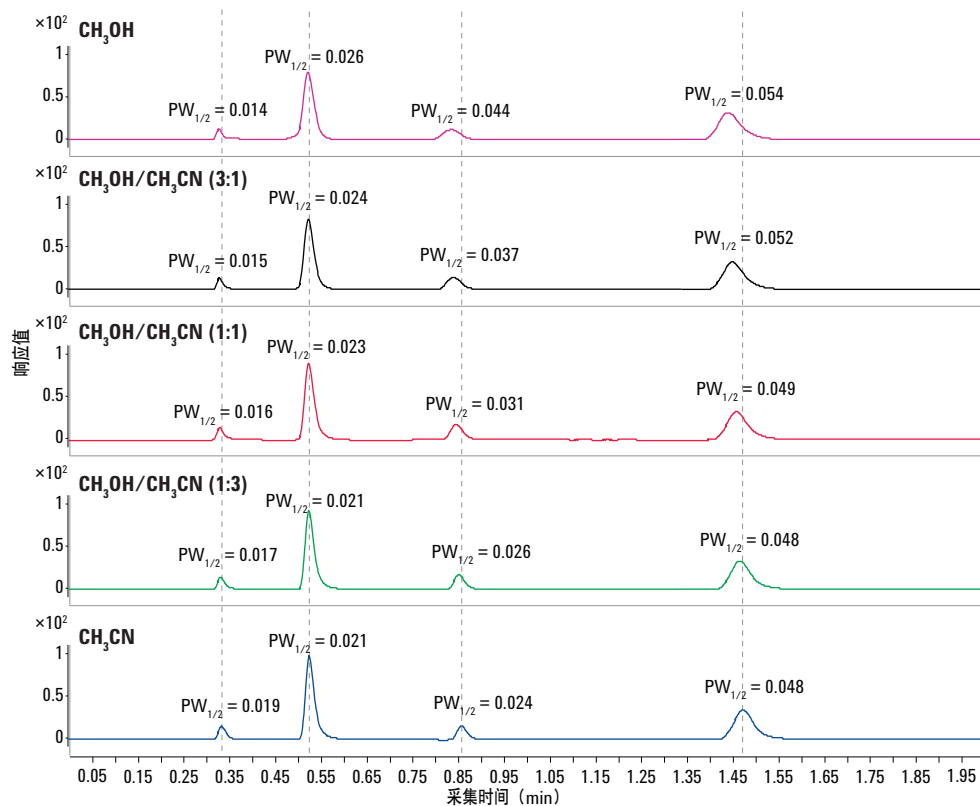


图 3B. 应用 2.1 × 50 mm, 1.8 μm Agilent ZORBAX RRHD HILIC Plus 色谱柱和配有 Agilent 6410A 三重四极杆质谱的 Agilent 1290 Infinity 液相色谱系统探究进样溶剂对 HILIC/LC/MS 分析性能的影响。甲醇 + 乙腈

系统: 配有 Agilent 6410A 三重四极杆质谱的 Agilent 1290 Infinity 液相色谱 系统

色谱柱: Agilent ZORBAX RRHD HILIC Plus, 2.1 × 50 mm, 1.8 μm (部件号 959757-901)

流动相: CH₃CN/100 mM NH₄HCO₂ pH 3.2 (9:1)

等度洗脱: 0.4 mL/min, 压力 = 135 bar

进样量: 进样 1 μL 浓度均为 5.7 μg/mL 的 4-氨基苯甲酸、烟酰胺、维生素 B₂ 和烟酸不同溶剂的溶液

柱温箱温度: 25 °C

MS 离子源: ESI+, 毛细管电压: 4000 V, 干燥气: 200 °C, 10 L/min, 雾化器压力: 30 psi, 驻留时间: 15 ms

MS 数据采集: MS2SIM: *m/z* 138 (Frag 110 V), *m/z* 123 (Frag 130 V), *m/z* 377 (Frag 160 V), *m/z* 124 (Frag 130 V)

样品制备: 准确量取 100 μL 乙腈储备液, 用色谱图左边标示的溶剂稀释至 1 mL, 使各化合物最终浓度为 5.7 μg/mL

结论

在 HILIC 模式下，应用 LC/MS/MS 成功分析了 4 种维生素 B 相关化合物。采用 Agilent ZORBAX RRHD HILIC Plus 色谱柱分析这些极性分析物可获得良好峰形和高柱效。此外，水作为 HILIC 模式下最强的洗脱溶剂，永远不要把它作为样品溶剂，因为它严重扭曲较早洗脱组分峰的峰形。在 HILIC 模式下，甲醇也是一种强溶剂，虽然比水强度弱，但也影响组分峰形和保留，虽然这种影响不像水作溶剂时那么显著。

参考文献

1. E. S. Grumbach, D. M. Wagrowski-Diehl, J. R. Mazzeo, B. Alden, P. C. Iraneta. *LC/GC Magazine*, **22**, 1011 (2004).
2. D. McCalley. *J. Chrom. A.* **1217**, 3408. (2010).
3. P. Hemström, K. Irgum. *J. Sep. Sci.* **29**, 1784 (2006).
4. D. McCalley. *J. Chrom. A.* **1171**, 46 (2007).
5. A. Mack. 通过增强 Agilent 1290 Infinity 液相色谱系统的超低扩散能力优化 Agilent ZORBAX RRHD Eclipse Plus C18 色谱柱性能。安捷伦科技有限公司，出版号 5990-9502CHCN (2011)。

更多信息

这些数据代表了典型的结果。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

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

本资料中的信息、说明和指标如有变更，恕不另行通知。

© 安捷伦科技（中国）有限公司，2012

2012 年 4 月 12 日，中国印刷

5991-0209CHCN



Agilent Technologies