

MaxPeak高性能表面(HPS)技术在改善灵敏度和动态范围方面的表现：关于核苷酸检测的案例分析

Moon Chul Jung, Matthew A. Lauber

Waters Corporation

摘要

用LC-MS分析对金属敏感的酸性分析物在方法耐用性和灵敏度方面存在挑战。研究人员在通过调节金属表面的化学吸附力来减少分析物损失上进行了大量尝试，但目前尚未获得能够与高灵敏度UPLC-MS分析兼容的通用解决方案。本研究使用腺苷核苷酸作为模型分析物，证明采用HPS技术的Waters ACQUITY Premier液相色谱系统能够提供出色的保护屏障，防止金属与分析物发生相互作用，同时又不影响高效UPLC分离与高灵敏度MS检测的优势。

优势

- 本案例研究展示了色谱表面对分析物检测产生重大影响的时机与方式。
- 采用MaxPeak高性能表面的Waters ACQUITY Premier液相色谱系统和色谱柱可显著改善对金属敏感的分析物（如核苷酸及其类似物）的回收率和峰形。

简介

核苷酸是DNA和RNA的组成部分，在新陈代谢中发挥着至关重要的作用，对其进行分析和定量是理解生物学功能和活动的关键一环^{1,2}。多年来，核苷酸及其类似物的研究受到越来越多的关注。研究人员正在开展一项非常重要的研究，将核苷酸型分子用作RNA聚合酶抑制剂来治疗病毒感染性疾病³，例如丙型肝炎⁴、某些病毒性癌症⁵、埃博拉病毒⁶以及最近出现的SARS-CoV-2 (COVID-19)⁷。

LC-MS方法分析核苷酸的难点之一是，这些分析物对金属表面（尤其是不锈钢和发生腐蚀的不锈钢）具有亲和力，会导致回收率低^{8,9}。低浓度分析物发生损失的后果可能比较严重，并会因此对分析灵敏度产生不利影响。为避免这些不良损失，分析人员采用了许多不同的解决方法。一部分分析人员尝试以聚合物或硅胶材料为组件配置不含金属的LC-MS仪器并进行测试，结果发现这些仪器与现代的亚2 μm颗粒UPLC方法不兼容⁹。其他分析人员通过在流动相中添加金属螯合剂来抑制金属与分析物的相互作用，在一定程度上取得了成功，但这种方法会缩小方法开发的选择范围¹⁰。

为此，沃特世开发出MaxPeak高性能表面(HPS)技术，能够为液相色谱仪器和色谱柱提供新型惰性表面¹¹。本应用纪要将使用腺苷及其磷酸化衍生物作为检测分析物证明MaxPeak HPS技术的优势，并以此案例研究展示色谱表面对分析物检测产生重大影响的时机与方式。

实验

样品描述：

ATP、ADP、AMP和腺苷的混合物水溶液

液相色谱条件

系统：	ACQUITY Premier UPLC、ACQUITY UPLC I-Class PLUS
检测器：	三重四极杆质谱仪

样品瓶:	TruView样品瓶
色谱柱:	ACQUITY UPLC HSS T3, 1.8 μ m, 2.1 \times 50 mm (采用标准不锈钢硬件, 部件号: 186003538) ACQUITY Premier HSS T3, 1.8 μ m, 2.1 \times 50 mm (部件号: 186009467)
柱温:	35 $^{\circ}$ C
样品温度:	20 $^{\circ}$ C
进样体积:	1 μ L
流速:	0.5 mL/min
流动相A:	10 mM醋酸铵, pH 6.8
流动相B:	乙腈

梯度表

时间 (min)	流速 (mL/min)	%A	%B	曲线
初始	0.5	98.8	1.2	-
0.2	0.5	98.8	1.2	6
0.8	0.5	81.0	19.0	6
0.9	0.5	81.0	19.0	6
1.0	0.5	98.8	1.2	6
3.0	0.5	98.8	1.2	11

质谱条件

系统：Xevo TQ-XS

电离模式：负离子电喷雾(ESI-)

采集范围：SRM：见下表

毛细管电压：-0.3 kV

碰撞能量：见下表

锥孔电压：见下表

	MW	通道	锥孔电压 (V)	碰撞能量 (eV)
ATP	507.18	505.96>158.84	30	30
ADP	427.20	425.98>134.00	48	22
AMP	347.22	346.00>96.85	50	20
腺苷	267.24	266.02>134.00	32	18

数据管理

色谱软件：MassLynx 4.2版

质谱软件：MassLynx 4.2版

信息学软件：N/A

结果与讨论

使用典型的反相LC-MS条件和三重四极杆质谱仪分析腺苷及其磷酸化衍生物：5'-三磷酸腺苷(ATP)、5'-二磷酸腺苷(ADP)和5'-单磷酸腺苷(AMP) (表1)。上述四种化合物的分离示例见图1。当样品进样至由不锈钢组件和色谱柱硬件组成的标准LC-MS系统时，高度磷酸化的ATP和ADP在分析过程中完全丢失。同时，单磷酸化衍生物AMP的峰发生明显拖尾，几乎检测不到(图1a)。将同样品进样至ACQUITY Premier色谱柱和ACQUITY Premier系统(图1c)时，四种包含腺苷的化合物全都能够轻松检出，峰形显著，峰拖尾大幅减少。峰面积和峰形的显著改善得益于创新的MaxPeak高性能表面有效抑制了金属与分析物相互作用。这两幅色谱图与中间情况(将样品进样至使用不锈钢液相系统的ACQUITY Premier色谱柱，图1b)的比较结果很有趣。虽然检出ATP和ADP峰，但与使用ACQUITY Premier液相色谱系统和色谱柱获得的峰(图1c)相比，这些峰明显更小。AMP的损失虽然不如ATP或ADP严重，但其峰形严重变形，使积分非常困难。该结果清楚地证明，金属与分析物相互作用对某些分析物的破坏性可能非常大，在这种情况下，使用惰性色谱表面非常重要。

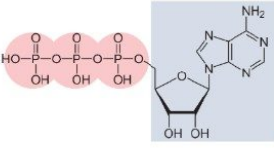
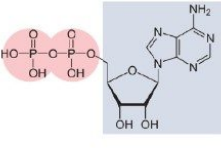
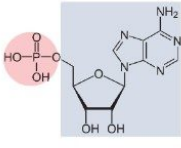
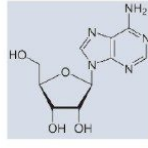
	ATP 5'-三磷酸腺苷	ADP 5'-二磷酸腺苷	AMP 5'-单磷酸腺苷	腺苷
				
	$C_{10}H_{15}N_5O_{13}P_3$	$C_{10}H_{15}N_5O_{10}P_2$	$C_{10}H_{15}N_5O_7P$	$C_{10}H_{15}N_5O_4$
MW	507.18	427.20	340.22	267.24
Log P*	-5.8	-4.7	-4.7	-2.1
pK _a * (最强的酸)	0.9	1.77	1.22	12.45

表1. 检测化合物。log P和pKa值来自人类代谢组学数据库，使用ChemAxon算法计算得出(<http://hmdb.ca/>)。

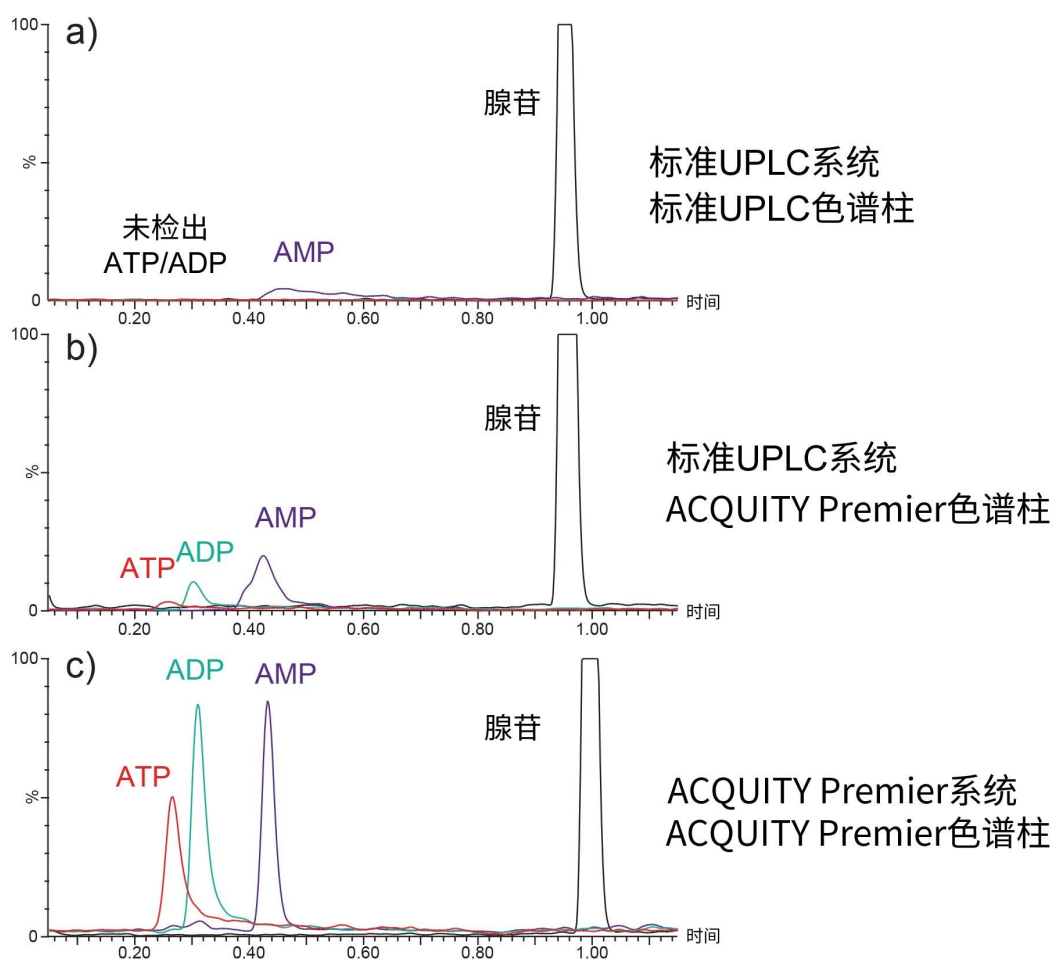


图1. 进样1 μL ATP、ADP、AMP和腺苷（各20 pg/μL）混合物样品的色谱图示例。

为进一步证明液相色谱性能的重要性，使用双对数坐标系绘制四种化合物的校准曲线（图2a），同时将相应的数值结果汇总于表2中。ATP和ADP是获得线性校准曲线的主要难题。使用标准液相色谱系统和标准色谱柱分析这些化合物时，即使在相对较高的浓度（2000 pg/μL，上样量2 ng）下也未观察到峰。将标准不锈钢色谱柱替换为ACQUITY Premier色谱柱后，虽然能够检出ATP和ADP，但校准范围明显窄于使用ACQUITY Premier色谱柱和全惰性ACQUITY Premier系统所获得的校准范围。分析物损失直接影响检测下限。例如AMP，其酸性低于ATP或ADP。尽管在测试的所有三种系统和色谱柱组合中，AMP的吸附损失均小于ATP或ADP，但检测灵敏度仍然存在很大差异。使用标准UPLC系统和色谱柱时，AMP的检测下限高出一个数量级（表2），校准曲线的斜率较低（图2b）。采用ACQUITY Premier液相色谱系统和ACQUITY Premier色谱柱后，四种分析物全都表现出优异的灵敏度：定量浓度可低于pg/μL水平，校准范围覆盖三个数量级。

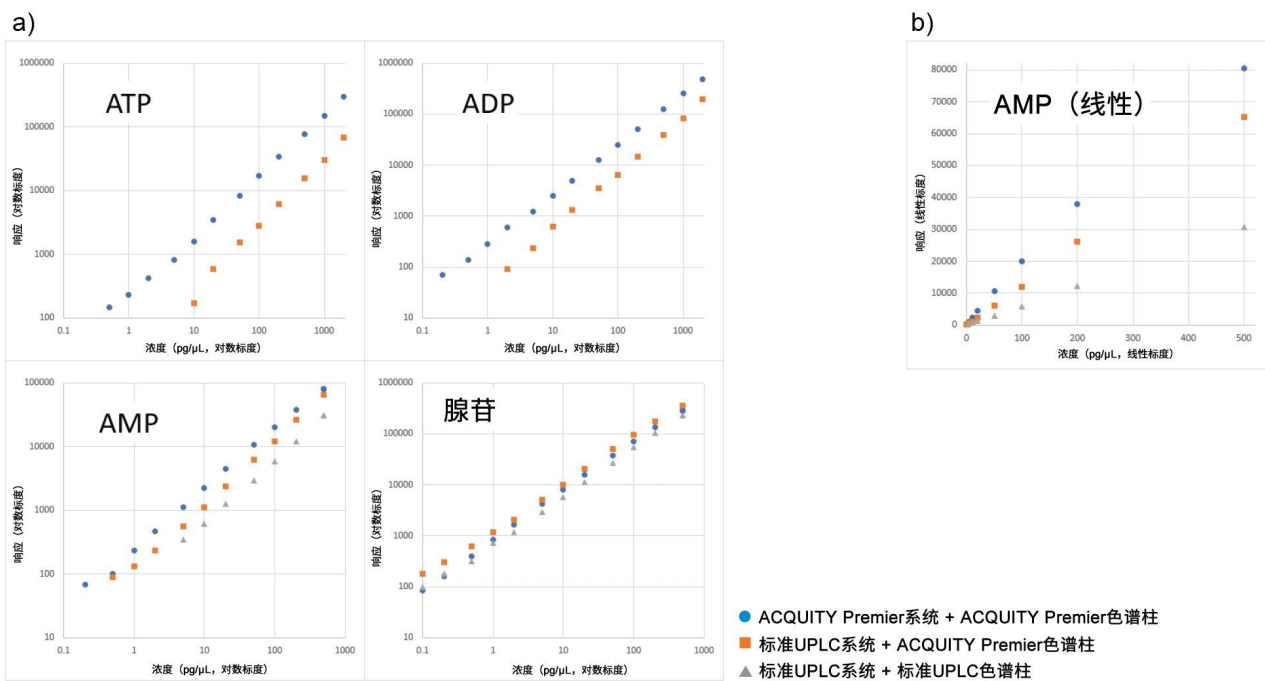


图2.a) 4种化合物的双对数校准曲线, b) AMP的线性校准曲线。

	ACQUITY Premier系统 ACQUITY Premier色谱柱		标准UPLC系统 ACQUITY Premier色谱柱		标准UPLC系统 标准UPLC色谱柱	
	范围 (pg/ μ L)	r^2	范围 (pg/ μ L)	r^2	范围 (pg/ μ L)	r^2
ATP	0.5-2000	0.9984	10-2000	0.9968	未检出	-
ADP	0.2-2000	0.9996	2-2000	0.9873	未检出	-
AMP	0.2-500	0.9877	0.5-500	0.9987	5-500	0.9995
腺苷	0.1-500	0.9877	0.1-500	0.9822	0.1-500	0.9947

表2.样品进样至不同的色谱柱和系统后,四种化合物的校准范围及其线性。所有校准曲线均采用1/x加权确定。

由于腺苷不含对金属敏感的磷酸基团,因此无论选择哪种LC系统和色谱柱,都能产生等效的校准曲线以及覆盖三个数量级的校准范围。这表明,含磷酸基团的化合物出现的灵敏度差异的确是源于分析物与金属相互作用导致的,使用ACQUITY Premier技术能够定量ATP、ADP和AMP,不会产生任何偏差以及与磷酸化分子相关的历史问题。

由于核苷酸是强极性分析物，因此在开发适用的色谱方法时应格外小心，尤其是在可能需要非常稳定的定量分析的情况下。本文采用RPLC方法结合HSS T3色谱柱和醋酸铵流动相，完成了有关惰性色谱表面影响的案例研究。所采用的分离技术无法保留所有腺苷核苷酸。实际上，ATP可能在死体积附近洗脱。因此，这种精确方法在处理复杂样品基质上的耐用性可能不足。分析人员可能发现，还有必要研究在亲水作用色谱(HILIC)和阴离子交换反相色谱柱技术中添加一些流动相离子对以及应用MaxPeak高性能表面的表现。

结论

使用由不锈钢组件制成的标准液相色谱系统和色谱柱难以分析腺苷核苷酸，例如ATP、ADP和ADP。因为这些化合物对裸露的金属表面具有很强的亲和力。具有两到三个磷酸基团的分析物所得到的结果最差。采用标准液相色谱系统和色谱柱时，ATP和ADP在样品浓度小于等于2 ng/μL的情况下完全丢失。具有单个磷酸基团的AMP表现出相对较小的损失，但其分析灵敏度仍然受到影响。

如本案例研究所示，ACQUITY Premier系统与ACQUITY Premier色谱柱配合使用可有效克服一些金属吸附挑战，从而避免对实现稳定的定量产生干扰。借助该技术，无论是采用适用的RPLC方法、HILIC还是混合模式色谱法，现在都能够将核苷酸的定量分析提升至全新水平。

参考资料

1. Esmans, E. L.; Broes, D.; Lemiere, F.; Vanhoutte, K. Liquid Chromatography–Mass Spectrometry in Nucleoside, Nucleotide and Modified Nucleotide Characterization.*J. Chromatogr.A.* 1998, 794,109–27.
2. Klawitter, J.; Schmitz, V.; Klawitter, J.; Leibfritz, D.; Christians, U. Development and Validation of an Assay for the Quantification of 11 Nucleotides using LC/LC-Electrospray Ionization-MS.*Analytical Biochemistry.*2007, 365, 230–9.
3. Oberg, B. Rational Design of Polymerase Inhibitors as Antiviral Drugs.*Antiviral Res.*2006, 71, 90–5.
4. Kumar, S.; Jacobson, I. M. Antiviral Therapy with Nucleotide Polymerase Inhibitors for Chronic Hepatitis C. *J. Hepatol.*2014, 61, S91–7.

5. Scott, C. L.; Swisher, E. M.; Kaufmann, S. H. Poly (ADP-Ribose) Polymerase Inhibitors: Recent Advances and Future Development. *J. Clin. Oncol.* 2015, 33, 1397-406.
6. Warren, T. K.; Jordan, R.; Lo, M. K.; Ray, A. S.; Mackman, R. L.; Soloveva, V.; *et al.* Therapeutic Efficacy of the Small Molecule GS-5734 against Ebola Virus in Rhesus Monkeys. *Nature.* 2016, 531, 381–5.
7. Chien, M.; Anderson, T. K.; Jockusch, S.; Tao, C.; Li, X.; Kumar, S.; *et al.* Nucleotide Analogues as Inhibitors of SARS-CoV-2 Polymerase, A Key Drug Target for COVID-19. *J. Proteome Res.* 2020.
8. Tuytten, R.; Lemièrre, F.; Witters, E.; Van Dongen, W.; Slegers, H.; Newton, R. P.; *et al.* Stainless Steel Electrospray Probe: A Dead End for Phosphorylated Organic Compounds? *J. Chromatogr.A.* 2006, 1104, 209–21.
9. De Vijlder, T.; Boschmans, J.; Witters, E.; Lemièrre, F. Study on the Loss of Nucleoside Mono-, Di- And Triphosphates and Phosphorylated Peptides to a Metal-Free LC–MS Hardware. *International Journal of Mass Spectrometry.* 2011, 304, 83-90.
10. Asakawa, Y.; Tokida, N.; Ozawa, C.; Ishiba, M.; Tagaya, O.; Asakawa, N. Suppression Effects of Carbonate on the Interaction between Stainless Steel and Phosphate Groups of Phosphate Compounds in High-Performance Liquid Chromatography and Electrospray Ionization Mass Spectrometry. *J. Chromatogr.A.* 2008, 1198–1199, 80–6.
11. Lauber, M.; Walter, T. H.; Gilar, M.; DeLano, M.; Boissel, C.; Smith, K.; Birdsall, R.; Rainville, P.; Belanger, J.; Wyndham, K. Low Adsorption HPLC Columns based on MaxPeak High Performance Surfaces. Waters White Paper, 720006930EN <<https://www.waters.com/waters/library.htm?&cid=135074078&lid=135074404>> , 2020.

特色产品

ACQUITY Premier系统 <<https://www.waters.com/waters/nav.htm?cid=135077739>>

ACQUITY UPLC I-Class PLUS系统 <<https://www.waters.com/134613317>>

Xevo TQ-XS三重四极杆质谱仪 <<https://www.waters.com/134889751>>

MassLynx MS软件 <<https://www.waters.com/513662>>

720007053ZH, 2020年11月

© 2022 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