

利用Atlantis Premier BEH Z-HILIC色谱柱改善RNA核苷酸、核苷以及核酸碱基的分离效果

Kenneth D. Berthelette, Steve Shiner, Thomas H. Walter, Jennifer M. Nguyen, Jonathan E. Turner

Waters Corporation

摘要

使用新型HILIC固定相是强极性分析物获得理想分离效果的关键所在。HILIC中的方法开发活动受限于可用固定相的独特性。虽然不同的色谱柱填料（即未键合硅胶）制造商之间存在很大差异，但使用不同的固定相，包括键合相类型或颗粒类型，仍然可以进一步提高选择性。本研究使用四种色谱柱通过一次分析分离13种RNA组分，其中包括核酸碱基、核苷以及核苷酸。我们在ACQUITY Premier系统中采用了ACQUITY UPLC BEH Amide色谱柱和Atlantis Premier BEH Z-HILIC色谱柱，以及另外两种市售的极性保留固定相色谱柱，四种色谱柱均采用2.1 x 50 mm色谱柱硬件。质谱检测使用Xevo TQD三重四极杆质谱仪在多重反应监测模式下完成。Atlantis Premier BEH Z-HILIC色谱柱使13种组分全部得到分离。在被测的三种两性离子固定相之间观察到选择性差异。在评价的四种色谱柱中，BEH Z-HILIC的独特填料颗粒与ACQUITY Premier色谱柱和系统硬件联用使结构相似且具有生物学相关性的化合物实现分离。

优势

- 分离13种具有生物学相关性和结构相似性的RNA组分
- 与其他两性离子固定相相比，Atlantis Premier BEH Z-HILIC色谱柱具有独特的选择性
- MaxPeak高性能表面可以改善核苷酸的峰形

简介

RNA组分分析是许多不同工作流程的重要环节，包括但不限于食品检测和代谢组学研究¹⁻⁵。RNA组分包括核酸碱基、核苷以及核苷酸，还包括在不同生物学功能过程中会发生修饰的RNA化合物。此外，RNA是核糖体和剪接体中重要的结构元件。RNA的残基及其可能的修饰通常作为不同疾病或跟踪治疗进展的生物标志物进行分析检测。

这种分析的挑战之一是这些组分的极性较强。可以使用反相LC，但通常需要离子对试剂来增加保留性，而代价是MS电离能力降低。此外，离子对试剂需要很长时间才能在系统中达到平衡，并且分析后可能会在LC中残留。通常情况下，即便使用了离子对试剂，在反相LC色谱柱中保留这些分析物仍然很困难。

分析这些化合物的另一种技术是亲水作用液相色谱法(HILIC)，其使用MS兼容的流动相和极性固定相，旨在保留极性分析物。HILIC方法可以轻松保留RNA组分，但由于各RNA组分的结构非常相似，因此仍然不能实现良好分离。本研究使用四种不同的固定相分离13种RNA组分。结果发现，核酸碱基、核苷、核苷酸以及磷酸核糖在Atlantis Premier BEH Z-HILIC色谱柱上的分离效果最好。

实验

样品描述

分析物购自Sigma Aldrich，将分析物溶于含0.1%甲酸的50:50乙腈:水溶液中，制成浓度为1.0 mg/mL的储备液。用1:1的乙腈:100 mM氢氧化钾溶液制备鸟嘌呤储备液(0.5 mg/mL)，使其适当溶解。组分的结构式如图1所示。合并储备液，制备下述浓度的样品：腺嘌呤、腺苷、胞嘧啶、胞苷、尿嘧啶、尿苷、鸟嘌呤、鸟苷（各2.0 μg/mL）、单磷酸腺苷(30 μg/mL)、单磷酸胞苷、单磷酸尿苷、单磷酸鸟苷和磷酸核糖（各50 μg/mL）。

方法条件

LC条件

LC系统： 配备四元溶剂管理器的ACQUITY Premier系统

检测条件： 多重反应监测（请参见表1）

样品瓶： LCMS TruView最大回收样品瓶（部件号

	: 186005668CV)
色谱柱:	ACQUITY UPLC BEH Amide (部件号 : 186004800) , Atlantis Premier BEH Z-HILIC (部件号 : 186009978) , 竞争厂商A: HILIC-Z, 竞争厂商B: Polar X; 全部采用2.1 x 50 mm硬件
柱温:	50 °C
样品温度:	10 °C
进样体积:	0.5 µL
流速:	0.5 mL/min
流动相A:	水
流动相B:	乙腈
流动相D:	200 mM甲酸铵, pH 3.0
梯度:	分离采用水和缓冲液梯度。水含量在5-40%之间变化, 缓冲液浓度在10-50 mM之间变化。详细内容见梯度表。

梯度表

时间 [min]	流速 [mL/min]	%A	%B	%D	曲线
0.00	0.5	0	95	5	6
10.36	0.5	15	60	25	6
11.57	0.5	15	60	25	6
11.63	0.5	0	95	5	6
15.00	0.5	0	95	5	6

质谱条件

质谱系统:	Xevo TQD
电离模式:	正离子和负离子模式 (见表1)
采集范围:	多重反应监测 (请参见表1)
毛细管电压:	3.0 kV
碰撞能量:	随分析物变化 (见表1)
锥孔电压:	随分析物变化 (见表1)

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:	MassLynx 4.2版

结果与讨论

RNA组分分析在许多研究领域都至关重要，包括食品和环境应用以及代谢组学工作流程。实现这些化合物的高选择性分离对于准确可靠的定量和改善表征非常有必要。亲水作用液相色谱(HILIC)是保留这些弱极性分析物的理想方法，且已应用于本研究。检测的13种分析物如图1所示。在Xevo TQD上使用多重反应监测(MRM)的检测条件见表1。

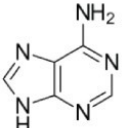
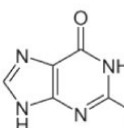
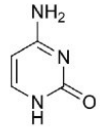
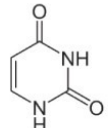
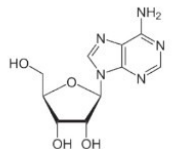
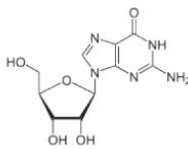
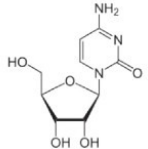
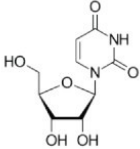
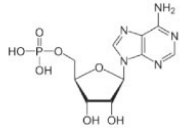
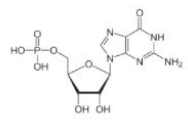
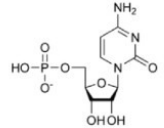
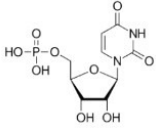
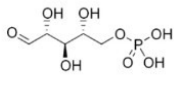
	腺嘌呤	鸟嘌呤	胞嘧啶	尿嘧啶	核糖
核碱基					N/A
核苷					N/A
核苷酸					

图1.核酸碱基、核苷和核苷酸的分析物结构。分析物结构由基础组分组成，除此之外，还分析了磷酸核糖。

化合物	电离模式	母离子 (m/z)	锥孔电压 (V)	子离子 (m/z)	碰撞能量 (V)
腺嘌呤	ESI+	136.0	30	119.0	20
腺苷	ESI+	268.0	30	136.0/119.0	10/45
AMP	ESI+	348.0	30	136.0/119.0	20/55
胞嘧啶	ESI+	112.0	30	95.0	20
胞苷	ESI+	244.0	30	112.0/95.0	15/45
CMP	ESI+	324.0	30	112.0/95.0	15/55
尿嘧啶	ESI-	111.0	20	N/A	N/A
尿苷	ESI-	243.0	20	200.0/110.0	10/15
UMP	ESI-	323.0	20	111.0	30
鸟嘌呤	ESI+	152.0	30	135.0	20
鸟苷	ESI+	284.0	30	152.0/135.0	15/35
GMP	ESI+	364.0	30	152.0/135.0	15/50
磷酸核糖	ESI-	229.0	20	97.0	15

表1.检测13种分析物的MRM条件，其他MS条件见实验部分。

我们针对该分离评价了四种HILIC固定相，筛选出ACQUITY UPLC BEH Amide、竞争厂商的HILIC-Z、竞争厂商的Polar X以及Atlantis Premier BEH Z-HILIC色谱柱，并针对上述分析物优化了方法。图2显示了使用水和甲酸铵梯度获得的分离结果。

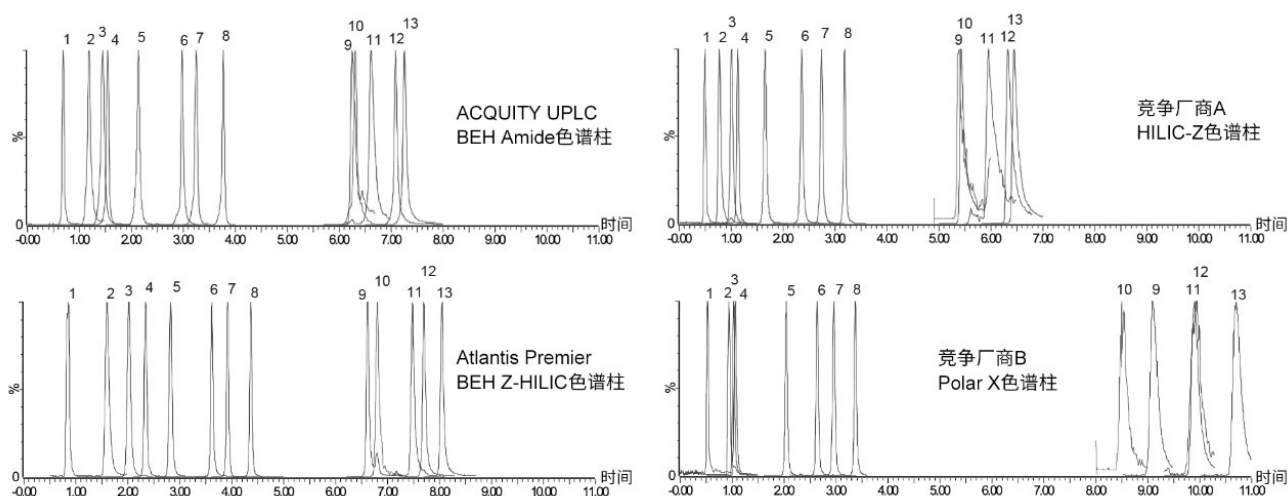


图2.13种RNA组分在四种不同的HILIC固定相上的分离结果。使用设定的MRM提高灵敏度。将峰高归一化，以显示化合物的分离结果，并且不反映获得的总体信号。峰标记分别为：1) 尿嘧啶，2) 腺嘌呤，3) 腺苷，4) 尿苷，5) 胞嘧啶，6) 鸟嘌呤，7) 胞苷，8) 鸟苷，9) 单磷酸腺苷，10) 单磷酸尿苷，11) 磷酸核糖，12) 单磷酸胞苷，13) 单磷酸鸟苷。

唯一能够使所有化合物都实现分离的色谱柱是Atlantis Premier BEH Z-HILIC色谱柱。其他色谱柱均出现至少一组

共洗脱化合物。虽然Xevo TQD仍然可以检出这些峰，但最好能够分离这些共洗脱探针，以便对这些物质进行更好地积分和表征。

除BEH Amide色谱柱以外，其他色谱柱均由两性离子或混合模式固定相组成。尽管如此，这些材料在保留性和选择性方面仍然存在差异。HILIC-Z固定相的保留性不及其他固定相，而Polar X固定相中单磷酸化合物的保留性良好，核酸碱基和核苷的保留性相当。三种固定相之间某些分析物的洗脱顺序也有所不同，差别最明显的是单磷酸腺苷和单磷酸尿苷（峰9和10）。造成选择性差异的原因是固定相的性质不同。HILIC-Z材料由连接表面多孔颗粒的两性离子键合相组成，Polar X色谱柱使用连接表面多孔颗粒的混合模式离子交换HILIC固定相，而BEH Z-HILIC使用连接全多孔BEH 95 Å颗粒的两性离子键合相。不同色谱柱填料之间的区别请参见图3。

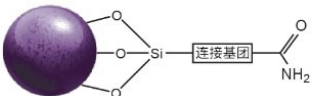

色谱柱名称	基质颗粒	键合相填料
ACQUITY UPLC BEH Amide	BEH 130 Å 全多孔杂化硅胶 pH容差：2-11	
Atlantis Premier BEH Z-HILIC	BEH 95 Å 全多孔杂化硅胶 pH容差：2-12	
HILIC-z	100 Å 表面多孔硅胶 pH容差：2-12	两性离子，未提供其他详细信息
Polar X	90 Å 表面多孔硅胶 pH容差：2-8	混合模式键合相，带HILIC和离子交换功能

图3.制造商提供的资料中基质颗粒填料和连接的键合相填料说明。

与BEH Z-HILIC相比，BEH Amide选择性的变化可能是由于键合相和基质颗粒的差异所致。这两种固定相都使用全多孔杂化硅胶颗粒，但BEH Z-HILIC使用BEH 95 Å颗粒，而BEH Amide使用BEH 130 Å颗粒。孔径和键合相的差异导致了表观选择性的差异。

Atlantis Premier BEH Z-HILIC色谱柱与其他色谱柱相比的另一个优势是可以改善磷酸化化合物的峰形。Atlantis Premier BEH Z-HILIC色谱柱与其他市售的两性离子色谱柱相比差异尤其明显，其他色谱柱获得的磷酸化物质峰形更宽。与BEH Z-HILIC色谱柱相比，ACQUITY UPLC BEH Amide色谱柱获得的峰也稍宽，但仍比其他两性离子色谱柱获得的峰窄。BEH Z-HILIC固定相中采用的MaxPeak高性能表面(HPS)硬件可减轻磷酸化化合物与色谱柱金属表面之间的次级相互作用。在某些条件下，这些金属和分析物的相互作用会导致峰形差异，如本例中所示，甚至

可能导致样品损失⁶。在本例中，由于四种色谱柱获得的峰面积相当，因此没有看到因金属吸附而导致的分析物损失。表2显示了四种研究的色谱柱技术中磷酸化化合物的峰形差异。

化合物	4.4%峰高处峰宽 ACQUITY UPLC BEH Amide	4.4%峰高处峰宽 Atlantis Premier BEH Z-HILIC	4.4%峰高处峰宽 HILIC-z	4.4%峰高处峰宽 Polar X
单磷酸腺苷	0.208	0.163	0.384	0.460
单磷酸尿苷	0.258	0.164	0.374	0.329
磷酸核糖	0.289	0.191	0.441	0.535
单磷酸胞苷	0.186	0.159	0.510	0.468
单磷酸鸟苷	0.259	0.159	0.535	0.420
4.4%峰高处 平均峰宽	0.240	0.167	0.449	0.443

表2.所有四种固定相上磷酸化化合物在4.4%峰高(sec)处的峰宽，计算出色谱柱平均峰宽。

Atlantis Premier BEH Z-HILIC色谱柱的平均峰宽比ACQUITY UPLC BEH Amide色谱柱窄30%，比其他竞争厂商色谱柱窄约60%。在BEH Z-HILIC色谱柱上获得的较窄峰有助于解析关键化合物对并提高灵敏度。BEH Z-HILIC采用独特的颗粒-键合相组合，结合MaxPeak HPS硬件，与其他HILIC固定相相比，13种分析物在该固定相上均实现分离，并获得良好峰形。

结论

我们利用包括Atlantis Premier BEH Z-HILIC色谱柱在内的四种不同的色谱柱分析了13种具有生物学相关性的RNA组分。这些化合物包括RNA核酸碱基、核苷和核苷酸，它们的结构相似，以往一直难以分离，尤其是在50 mm的短色谱柱上。新型Atlantis Premier BEH Z-HILIC色谱柱能够利用水、乙腈和甲酸铵的梯度，通过单次运行分离所有化合物。此外，与其他被测色谱柱相比，Atlantis Premier BEH Z-HILIC色谱柱可以使核苷酸获得更好的峰形，其部分原因是该色谱柱采用了MaxPeak HPS技术，减轻了磷酸基团与色谱柱金属硬件之间的相互作用。将Atlantis Premier BEH Z-HILIC色谱柱与ACQUITY Premier系统结合使用，可以定量所有核酸碱基、核苷和核苷酸以及磷酸核糖。准确测定核苷酸和核苷对于许多疾病的诊断至关重要，包括癌症和某些呼吸系统疾病。

参考资料

1. Inoue, K.; Obara, R.; Hino, T.; Oka, H. Development and Application of an HILIC-MS/MS Method for the Quantitation of Nucleotides in Infant Formula. *J. Agricultural and Food Chemistry* 2010, 58(18), 9918–9924.
2. Logotheti, M.; Theochari, K.; Kostakis, M.; Pasiadis, I.; Thomaidis, N. Development and Validation of a HILIC–UV Method for the Determination of Nucleotides in Fish Samples. *Food Chemistry* 2018, 248, 70–77.
3. Mateos-Vivas, M.; Rodriguez-Gonzalo, E.; Domingues-Alvarez, J.; Garcia-Gomez, D.; Carabias-Martinez, R. Determination of Nucleosides and Nucleotides in Baby Food by Hydrophilic Interaction Chromatography Coupled to Tandem Mass Spectrometry in the Presence of Hydrophilic Ion-Pairing Reagents. *Food Chemistry* 2016, 211, 827-835.
4. Zhao, H.; Wang, X.; Li, H.; Yang, B.; Yang, H.; Huang, L. Characterization of Nucleosides and Nucleobases in Natural Cordyceps by HILIC-ESI/TOF/MS and HILIC-ESI/MS. *Molecules* 2013, 18(8), 9755–9769.
5. Chen, P.; Li, W.; Li, Q.; Wang, Y.; Li, Z.; Ni, Y.; Koike, K. Identification and Quantification of Nucleosides and Nucleobases in Geosaurus and Leech by Hydrophilic-Interaction Chromatography. *Talanta* 2011, 85(3), 1634–1641.
6. Jung, M.; Lauber, M. 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研究. 沃特世应用纪要, [720007053ZH](https://www.waters.com/nextgen/us/en/library/application-notes/2020/demonstrating-improved-sensitivity-and-dynamic-range-with-maxpeak-high-performance-surfaces-hps-technology-a-case-study-on-the-detection-of-nucleotides.html) <<https://www.waters.com/nextgen/us/en/library/application-notes/2020/demonstrating-improved-sensitivity-and-dynamic-range-with-maxpeak-high-performance-surfaces-hps-technology-a-case-study-on-the-detection-of-nucleotides.html>>, 2020.

特色产品

- [ACQUITY Premier系统](https://www.waters.com/waters/nav.htm?cid=135077739) <<https://www.waters.com/waters/nav.htm?cid=135077739>>
- [Xevo TQD三重四极杆质谱仪](https://www.waters.com/134608730) <<https://www.waters.com/134608730>>

- [MassLynx MS软件 <https://www.waters.com/513662>](https://www.waters.com/513662)
- [Atlantis Premier色谱柱 <https://www.waters.com/waters/nav.htm?cid=513211>](https://www.waters.com/waters/nav.htm?cid=513211)

720007324ZH, 2021年7月



© 2021 Waters Corporation. All Rights Reserved.