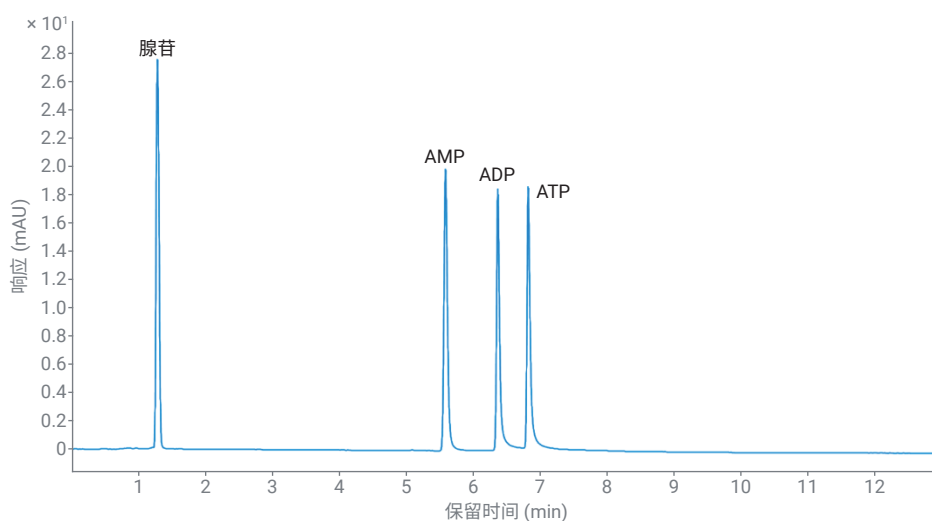


四种不同的液相色谱系统分析核苷酸的可比性研究

比较生物液相色谱系统与不锈钢系统



作者

Sonja Schneider
安捷伦科技有限公司

摘要

磷酸化合物对于不锈钢流路的液相色谱 (LC) 系统而言是一种具有挑战性的分子。峰形不佳和样品损失会影响数据质量，从而降低所生成数据的可信度。在本应用简报中，使用了四种不同的安捷伦液相色谱系统（两种低吸附液相色谱系统和两种不锈钢系统）分析了腺苷和三种相应的核苷酸。对四种系统在峰形和样品损失方面的性能进行了比较和评估。两种低吸附生物液相色谱系统的性能均明显优于不锈钢液相色谱系统，并获得了高重现性数据。

前言

色谱工作者的目标是获得具有对称高斯峰形且实现基线分离的峰。峰形对称和回收率高是液相色谱系统性能良好的表现。色谱流路表面与样品之间不存在不利或不可预测相互作用的系统被认为是理想的液相色谱系统。吸附作用通常会导致峰形发生变化,例如峰不对称或峰拖尾,并且所分析样品的回收率会显著降低^[1,2]。

对于不锈钢系统而言,磷酸化组分的分析尤其具有挑战性,因为磷酸基团与流路中含铁的不锈钢成分之间相互作用会导致峰拖尾和样品损失。核苷酸对这种相互作用尤其敏感^[3]。而肽、糖类、脂类和多聚糖等其他磷酸化化合物也存在这一问题^[4]。

防止磷酸化样品与不锈钢成分之间相互作用的一种可能方式是进行老化处理,使极性表面基团失活,减少从液相色谱系统中洗脱的金属量。然而,这些处理大多涉及使用强金属螯合剂或酸性溶液进行耗时且繁琐的过夜冲洗,这可能会损坏液相色谱系统,降低分析效率并缩短仪器使用寿命^[2,5]。

使用 Agilent 1260 Infinity II 生物惰性液相色谱、Agilent 1260 Infinity II Prime 生物液相色谱和 Agilent 1290 Infinity II 生物液相色谱等低吸附液相色谱系统可以提高分析物回收率,限制不利的相互作用,并且无需进行繁琐的老化处理^[2]。本应用简报比较了使用配备 PEEK 内衬 HILIC 色谱柱的四种不同安捷伦液相色谱系统(两种低吸附液相色谱系统和两种不锈钢系统)分析腺苷及其磷酸化衍生物时,在样品损失、峰形和重现性方面的差异。

实验部分

设备

Agilent 1260 Infinity II 生物惰性液相色谱系统,包括以下模块:

- Agilent 1260 Infinity II 生物惰性泵 (G5654A)
- Agilent 1260 Infinity II 生物惰性 Multisampler (G5668A), 配备 Agilent InfinityLab 样品恒温箱 (G5668A#101)
- Agilent 1260 Infinity II 高容量柱温箱 (G7116A), 配备生物惰性标准流速热交换器
- Agilent 1260 Infinity II 二极管阵列检测器 WR (G7115A), 配备生物惰性标准流通池 (10 mm, G4212-60007)

Agilent 1260 Infinity II Prime 生物液相色谱系统,包括以下模块:

- Agilent 1260 Infinity II 生物全能泵 (G7131C)
- Agilent 1290 Infinity II 生物 Multisampler (G7137A), 配备样品恒温箱 (选件 #101)
- Agilent 1290 Infinity II 高容量柱温箱 (G7116B), 配备标准流速生物兼容性热交换器 (G7116-60071)
- Agilent 1290 Infinity II 可变波长检测器 (G7114B), 配备生物兼容性微量流通池, 3 mm, 2 μ L, 带 RFID 标签 (G1314-60189)

Agilent 1290 Infinity II 液相色谱系统,包括以下模块:

- Agilent 1290 Infinity II 全能泵 (G7104A)
- Agilent 1290 Infinity II Multisampler (G7167B), 配备样品恒温箱 (选件 #101)
- Agilent 1290 Infinity II 高容量柱温箱 (G7116B), 配备标准流速热交换器
- Agilent 1290 Infinity II 可变波长检测器 (G7114B), 配备微量流通池, 3 mm, 2 μ L (G1314-60187)

Agilent 1260 Infinity II 液相色谱系统,包括以下模块:

- Agilent 1260 Infinity II 四元泵 (G7111B)
- Agilent 1290 Infinity II Multisampler (G7167A), 配备样品恒温箱 (选件 #101)
- Agilent 1260 Infinity II 高容量柱温箱 (G7116A), 配备标准流速热交换器
- Agilent 1290 Infinity II 可变波长检测器 (G7114B), 配备微量流通池, 3 mm, 2 μ L (G1314-60187)

软件

Agilent OpenLab CDS 2.5 版或更新版本

色谱柱

InfinityLab Poroshell 120 HILIC-Z, 2.1 $\times$ 150, 2.7 μ m, 带 PEEK 内衬 (部件号 673775-924)

化学品

所有试剂纯度均为液相色谱级。乙腈 (ACN) 购自 Merck (Darmstadt, Germany)。新制超纯水来自配置 0.22 µm 膜式终端过滤器 (Millipak) 的 Milli-Q Integral 水纯化系统 (Millipak, Merck-Millipore, Billerica, MA, USA)。乙酸铵、氢氧化铵、腺苷、腺苷-5'-单磷酸盐、腺苷-5'-二磷酸钠盐和腺苷-5'-三磷酸二钠盐水合物购自 Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany)。

样品

将腺苷、腺苷-5'-单磷酸盐、腺苷-5'-二磷酸钠盐和腺苷-5'-三磷酸二钠盐水合物溶于温水中，并以 80、133、200 和 400 µmol/L 的浓度混合，生成等摩尔浓度混合溶液。

注：腺苷在温水中的溶解效果更好，在冷水中的溶解效果较差。

缓冲液配制

配制 100 mmol/L 乙酸铵储备液，并将 pH 调节至 9。使用 0.2 µm 滤膜过滤配制的储备液。为配制 1 L 洗脱液 A，将 100 mL 储备液与 900 mL 水混合。为配制洗脱液 B，将 100 mL 储备液与 900 mL 乙腈混合。

方法

表 1. 色谱条件

参数	值
溶剂	A) 10 mmol/L 乙酸铵, pH 9 B) ACN:100 mmol/L 乙酸铵, pH 9 (9:1 (v:v))
梯度	0 分钟: 90% B 12 分钟: 50% B 13 分钟: 50% B 后运行时间 10 分钟
流速	0.400 mL/min
温度	35 °C
检测	260 nm 20 Hz
进样	进样量: 1 µL 样品温度: 10 °C 进样针清洗: 用水清洗 3 秒

结果与讨论

在此应用中，分析顺序非常重要，因为从 HPLC 设备浸出的金属离子会影响带 PEEK 内衬分离柱的性能。首先，使用完全基于 PEEK 的低吸附系统 1260 Infinity II 生物惰性液相色谱仪开始流程。接着，将分析转移至基于 MP35N 的低吸附系统 1260 Infinity II Prime 生物液相色谱仪 (MP35N 是一种镍钴合金)。然后，将分析转移至第一个不锈钢系统 1290

Infinity II 液相色谱仪，最后转移至第四个系统 1260 Infinity II 液相色谱仪。需要重点说明的是，所有实验使用的溶剂、样品，以及最重要的色谱柱都完全相同。为防止磷酸化样品降解，所有样品均新鲜制备并冷却至 10 °C。所有分析均在三天内连续进行。

使用 Agilent 1260 Infinity II 生物惰性液相色谱仪进行的第一个分析流程结果如图 1 所示。四个峰均实现基线分离，并且峰形良好，保留时间 (RT) 和峰面积的相对标准偏差 (RSD) 较低。需要注意的是，与反相色谱相比，HILIC 在峰形方面可能面临挑战，因为在 HILIC 中不利的次级相互作用更为常见^[6]。考虑到 HILIC 色谱的严格要求，峰形表现良好，拖尾非常小。

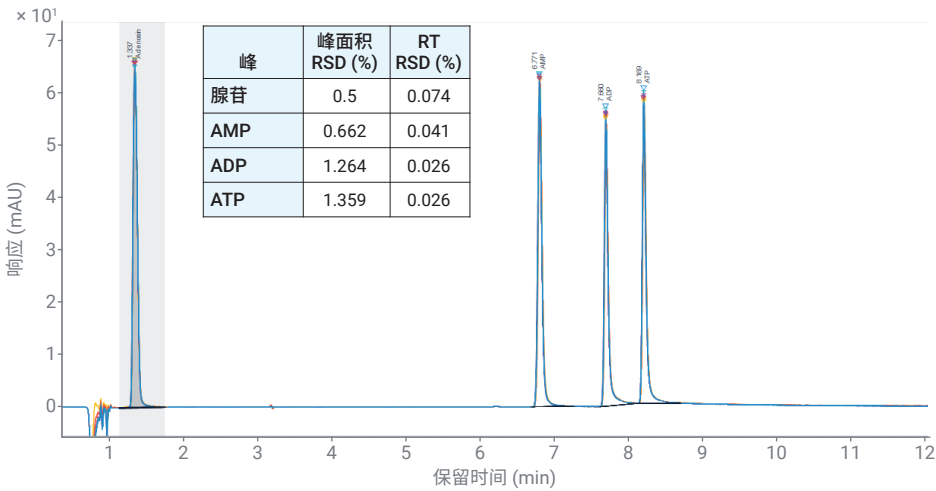


图 1. 使用 Agilent 1260 Infinity II 生物惰性液相色谱仪通过七次连续运行分离核苷酸

使用 Agilent 1260 Infinity II Prime 生物液相色谱仪进行的第二个分析流程结果如图 2 所示。与使用 1260 Infinity II 生物惰性液相色谱仪获得的结果相同，四个峰均实现基线分离，并且峰形良好，保留时间 (RT) 和峰面积的相对标准偏差 (RSD) 较低。由于低扩散系统使腺苷峰形更尖锐，因此与三个磷酸化核苷酸峰相比，腺苷峰的强度更高。然而，四个核苷酸峰的峰面积百分比与 1260 Infinity II 生物惰性液相色谱仪获得的峰面积百分比相当，表明两种系统在核苷酸分析方面性能相当。由于本研究使用的 1260 Infinity II 生物惰性液相色谱系统配备了 DAD，与其他配备 VWD 的系统相比，峰强度总体上更高。

使用不锈钢流路 1290 Infinity II 液相色谱仪进行的第三个分析流程结果看起来完全不同 (图 3)。虽然腺苷峰在峰高/峰面积和峰形方面与前两种系统相当，但三种磷酸化核苷酸的峰外观却有很大不同。腺苷在此处可被视为一种内标，由于它不包含任何可与铁反应的磷酸基团，因此在所有液相色谱系统中应具有完全相同的表现。相比之下，AMP (特别是 ADP 和 ATP) 则普遍存在拖尾。此外，样品损失量随着分子上连接的磷酸基团的增加而增加 (同见图 5)。可以观察到不锈钢毛细管中的铁与其他成分之间的相互作用。

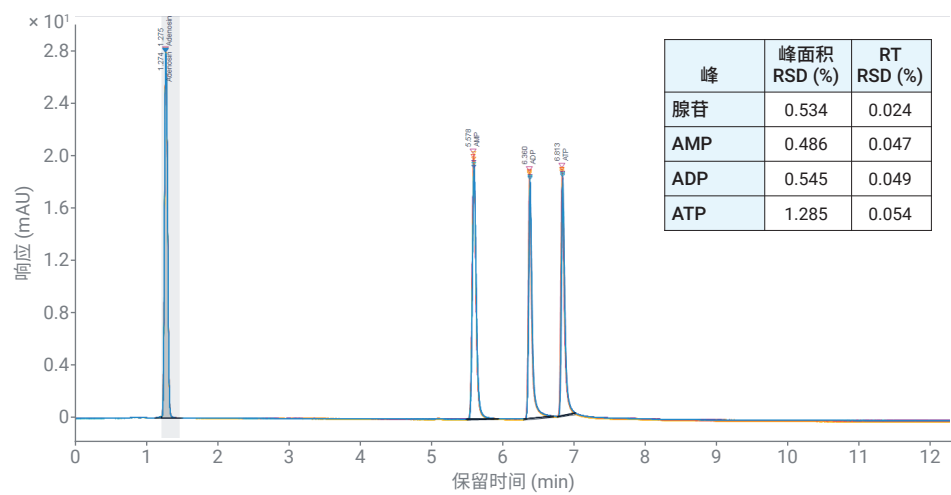


图 2. 使用 Agilent 1260 Infinity II Prime 生物液相色谱仪通过七次连续运行分离核苷酸

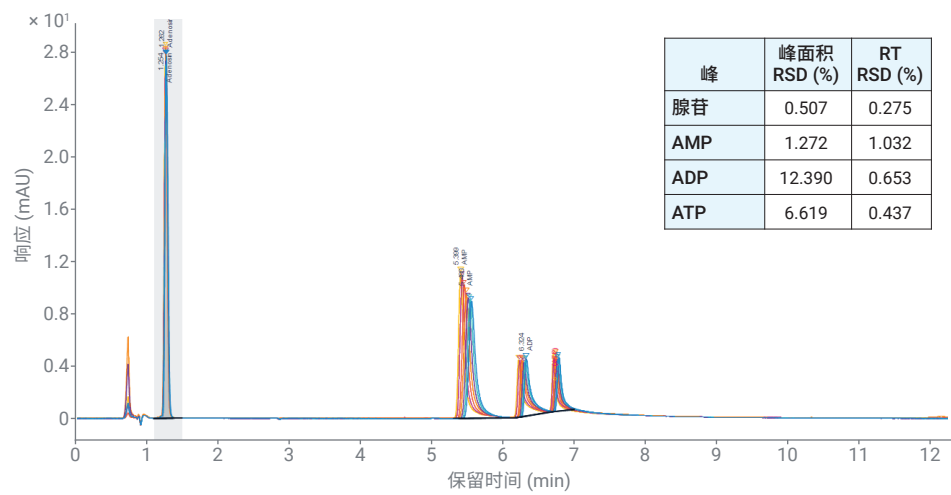


图 3. 使用 Agilent 1290 Infinity II 液相色谱仪通过七次连续运行分离核苷酸

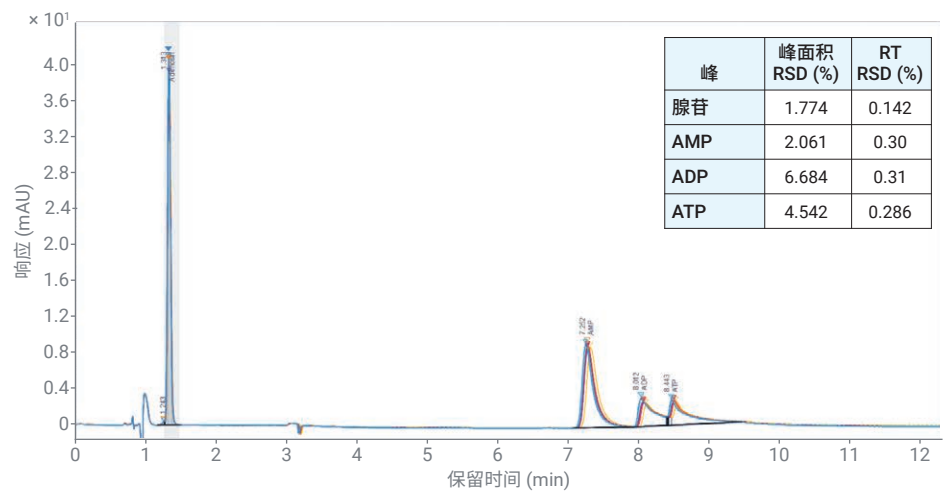


图 4. 使用 Agilent 1260 Infinity II 液相色谱仪通过七次连续运行分离核苷酸

与使用 1290 Infinity II 液相色谱仪进行的分析类似，使用 1260 Infinity II 液相色谱仪进行的分析也显示出明显的峰拖尾以及磷酸化核苷酸的高样品损失，见图 4 和图 5。

图 5 总结了所有四种分析系统的样品损失结果。使用腺苷作为内标计算得到峰面积损失。由于腺苷上没有连接磷酸基团，预测其与液相色谱系统的含铁成分之间不存在相互作用。因此，使用数学公式计算峰面积损失（公式 1）：

假设仅使用 PEEK 涂层毛细管和其他生物惰性材料的 1260 Infinity II 生物惰性系统是金标准。为了排除色谱柱和备件等其他因素，将峰面积损失值基于 1260 Infinity II 生物惰性系统进行归一化。

首先，峰面积损失随着分子上连接的磷酸基团的增加而增加，因为磷酸基团越多，与含铁材料的相互作用越强。

其次，很明显，仅在 SST 系统中观察到峰面积损失，在两种生物系统中没有观察到峰面积损失方面的差异。因此可以推断，与 Agilent 1260 Infinity II 生物惰性液相色谱仪相比，基于 MP35N 的 1260 Infinity II Prime 生物液相色谱系统同样适用于核苷酸分析。

对不同浓度的核苷酸进行分析，评估浓度因子对基于 SST 的 1290 Infinity II 液相色谱仪样品损失的影响。图 6 显示了样品损失量百分比与不同浓度的磷酸化核苷酸之间的关系图。对四种不同的浓度进行了分析：80、133、200 和 400 μmol/L。如上所述，ADP 和 ATP 的样品损失更为明显。例如，在 80 μmol/L 的较小浓度

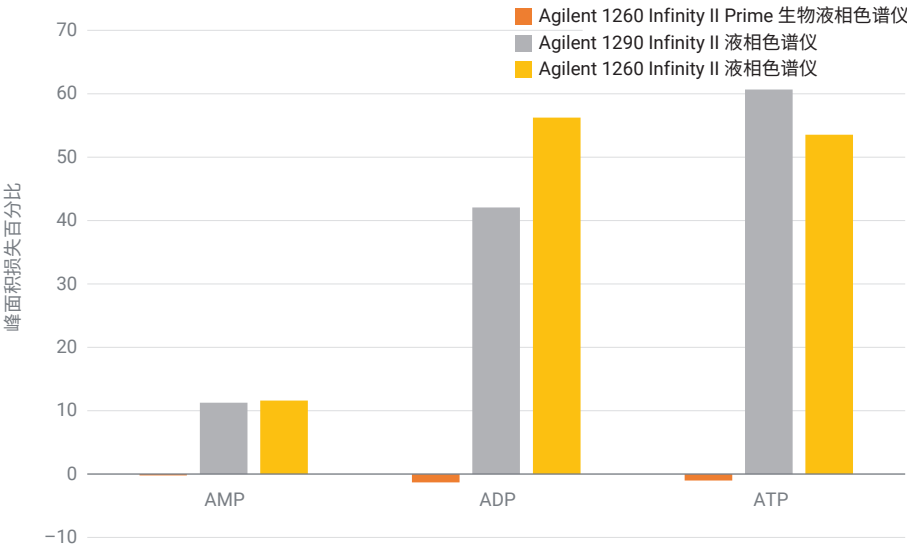
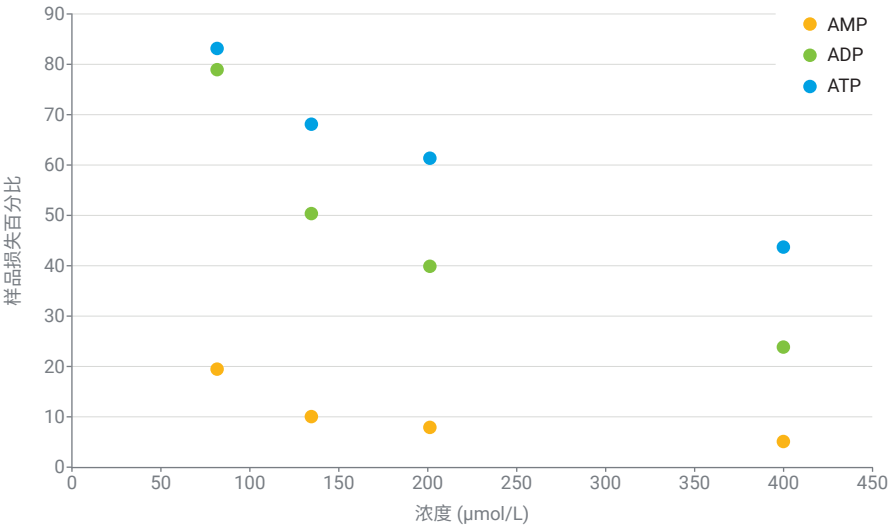


图 5. 相对于 Agilent 1260 Infinity II 生物惰性液相色谱仪的峰面积损失百分比

公式 1.

$$\text{峰面积损失} = 100 - \left(\frac{A_{\text{AXP,SS}}}{A_{\text{腺苷,SS}}} \times \frac{A_{\text{腺苷,生物}}}{A_{\text{AXP,生物}}} \times 100 \right)$$



样品损失百分比	80 μmol/L	133 μmol/L	200 μmol/L	400 μmol/L
腺苷	0	0	0	0
AMP	19.71	10.23	8.13	5.19
ADP	79.12	50.49	39.99	24.11
ATP	83.31	68.15	61.55	43.86

图 6. 使用基于 SST 的 Agilent 1290 Infinity II 液相色谱仪分析磷酸化核苷酸的样品损失

下，ATP 的相对样品损失超过 80%。对于 5 倍浓度 400 $\mu\text{mol/L}$ ，相对样品损失减少到 44% 左右。这再次表明，在较高浓度下，液相色谱系统的影响减小，所用色谱柱（带 PEEK 内衬 vs SST 材质）的影响则更大^[3]。

结论

两种低吸附生物液相色谱仪（全生物惰性 Agilent 1260 Infinity II 生物惰性液相色谱仪和使用 MP35N 作为主要材料的 Agilent 1260 Infinity II Prime 生物液相色谱仪作为生物兼容性液相色谱系统）在分析对铁敏感的磷酸化核苷酸时，表现出非常相似的优异性能，且无需进行耗时的钝化处理。相比之下，在没有进行钝化处理的情况下，基于不锈钢的液相色谱系统（Agilent 1290 Infinity II 液相色谱仪和 Agilent 1260 Infinity II 液相色谱仪）表现出明显的磷酸化化合物峰拖尾和峰面积损失，其中 ADP 和 ATP 尤为严重。与生物液相色谱系统相比，两种 SST 液相色谱系统中磷酸化化合物的保留时间和峰面积精度均更低。结果表明，样品损失与浓度高度相关，浓度越低，峰面积损失越明显。因此，强烈建议使用这两种生物液相色谱系统进行核苷酸的重现性分析，大幅降低系统组件造成样品损失的风险，让您对生成的数据充满信心。

参考文献

1. Wakamatsu A.; Morimoto, K.; Kudoh, S. A Severe Peak Tailing of Phosphate Compounds Caused by Interaction with Stainless Steel Used for Liquid Chromatography and Electrospray Mass Spectrometry. *J. Sep. Sci.* **2005**, 28, 1823–1830
2. Fekete, S. Defining Material Used in Biopharmaceutical Analysis. *LCGC Europe* **2021**, 34, 245–248
3. HPLC-DAD Analysis of Nucleotides Using a Fully Inert Flowpath（使用全惰性流路对核苷酸进行 HPLC-DAD 分析），安捷伦科技公司应用简报，出版号 5994-0680EN，**2019**
4. Tuytten, R. et al. Stainless Steel Electrospray Probe: a Dead End for Phosphorylated Organic Compounds? *J. Chromatogr. A* **2006**, 1104, 209–221
5. Hsiao, J. J. et al. Improved LC/MS Methods for the Analysis of Metal-Sensitive Analytes Using Medronic Acid as a Mobile Phase Additive. *Anal. Chem.* **2018**, 90(15), 9457–9464
6. Heaton, J. C.; McCalley, D. V. Some Factors that Can Lead to Poor Peak Shape in Hydrophilic Interaction Chromatography, and Possibilities for Their Remediation. *J. Chromatogr. A* **2016**, 1427, 37–44

查找当地的安捷伦客户中心：

www.agilent.com/chem/contactus-cn

免费专线：

800-820-3278, 400-820-3278（手机用户）

联系我们：

LSCA-China_800@agilent.com

在线询价：

www.agilent.com/chem/erfq-cn

www.agilent.com

DE83266022

本文中的信息、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，2021

2021 年 12 月 2 日，中国出版

5994-4392ZHCN