

使用Waters Premier标准品研究色谱表面的惰性

Amit Patel, Jennifer Simeone, Mathew Delano, Jason Dyke, Susan C. Rzewuski, Moon Chul Jung, Stephen J. Shiner

Waters Corporation

摘要

确保仪器处于正常的工作状态是实施任何分析测量的关键。无法确认系统适应性可能导致结果不确定，进而得出不正确的结论。评估系统适应性时，对于难以处理、分离和测量的分析物需要特别注意，例如容易与金属螯合的分析物分子。为更好地促进此类分子的分离，沃特世设计出ACQUITY Premier系统和MaxPeak Premier色谱柱，其色谱表面采用杂化硅胶颗粒，而不是金属或金属合金。在采用MaxPeak Premier仪器或尝试采取解决方法时，分析人员考虑的检测方法应能够揭示系统对金属敏感化合物的惰性。基于此目的，沃特世开发出两种检测标准品。从化学角度来说，核苷酸是一种有用的测试探针，但其容易水解。因此，我们使用不可水解的二磷酸腺苷(ADP)类似物作为替代方案，延长标准品的保质期并提高溶液稳定性。该类似物的分子为5'-(α,β -亚甲基)二磷酸腺苷(AMPcP)，制剂形式有仅含AMPcP的标准品以及AMPcP与腺苷的等摩尔混合物。

在ACQUITY Premier和ACQUITY UPLC H-Class PLUS Bio系统上使用每种标准品表征与金属相互作用的程度。两种检测方法成功表明，与标准ACQUITY UPLC H-Class PLUS Bio系统相比，惰性ACQUITY Premier系统中的金属结合明显减少。具体而言，AMPcP标准品在进样至样品流路后表现出更高的回收率重现性。从ACQUITY UPLC H-Class PLUS Bio系统切换为ACQUITY Premier系统后，五次重复进样的峰面积RSD从20%降至0.2%。此外，使用部分配置有HPS的ACQUITY Premier系统重复进样AMPcP和咖啡因，通过峰面积相对标准偏差增加以及峰面积比

降低（AMPcP相对于咖啡因），能轻易地识别出暴露的金属表面。还观察到绝对峰面积增加和峰形改善。AMPcP和腺苷的混合物标准品采用色谱分离法进行检测，同样发现ACQUITY Premier系统明显提高了AMPcP/腺苷的峰面积比，进而提高了金属敏感分析物的回收率。

优势

- MaxPeak高性能表面(HPS)有利于改善金属敏感分析物的回收率和峰形
- 将Waters Premier标准品用作质量控制标准品(QCRM)，以潜在的系统适应性试验技术评估惰性液相色谱仪的性能
- 对于过去棘手的金属敏感分析物，明显提升结果确定性

简介

常规应用系统适应性测试可确保任意分析测量结果的准确度。将液相色谱仪与UV检测器联用时，系统适应性测试通常为确认泵功能正常（例如，能够提供所需的梯度和流速）、自动进样器功能正常（例如，能够精确地提供指定体积的样品）、检测器功能正常（例如，能够在多个选定波长下以可接受的基线采集UV吸光度）以及总体系统完整性正常（例如，不存在泄漏、压力达峰以及噪音高出可接受水平的情况）。确认以上功能正常对于生成可靠的数据至关重要，整个行业和政府实验室都需要执行。

确认系统适应性常用的一种方法是分析质量控制标准品(QCRM)。例如，分析人员可以在分析关键样品或材料之前先分析多组分混合物。制备包含目标分析物的定制级混合物是评估系统准备状态的常用方法。随后将测量结果与预期结果或先前的结果进行对比，确认系统性能是否正常。

与无相互作用的分析物相比，通过分析已知或疑似与金属结合的化合物开展系统适应性评估，本身就更为复杂。使用不含金属敏感化合物的QCRM无法表征液相色谱系统中裸露金属被掩盖或消除的程度。解决该重要问题有一种备受青睐的方法，即使用金属敏感型探针化合物，经证明，这种化合物能够轻松检测液相色谱流路（包括色谱柱和检测器）中的裸露金属。基于AMPcP的Waters Premier标准品操作起来非常简单，本研究用其研究液相色谱设备的惰性，评估了所开发的标准品在金属结合有效性、稳定性和生产重现性方面的表现。

实验

样品描述

本研究使用了Waters Premier AMPcP标准品（部件号：[186009754 < https://www.waters.com/nextgen/us/en/shop/standards--reagents/186009754-waters-premier-ampcp-standard.html>](https://www.waters.com/nextgen/us/en/shop/standards--reagents/186009754-waters-premier-ampcp-standard.html)）、Waters Premier AMPcP和腺苷标准品（部件号：[186009755 < https://www.waters.com/nextgen/us/en/shop/standards--reagents/186009755-waters-premier-ampcp-and-adenosine-standard.html>](https://www.waters.com/nextgen/us/en/shop/standards--reagents/186009755-waters-premier-ampcp-and-adenosine-standard.html)）和咖啡因标准品（部件号：[700003233 < https://www.waters.com/nextgen/us/en/shop/standards--reagents/700003233-caffeine-standard.html>](https://www.waters.com/nextgen/us/en/shop/standards--reagents/700003233-caffeine-standard.html)）。用100 μL 的水和100 μL 的乙腈复溶AMPcP标准品，再用40 μL 的水和160 μL 的乙腈配制单独的标准品。使用200 μL 水复溶AMPcP和腺苷混合物标准品。将100 μL 的1.000 mg/mL咖啡因标准品用900 μL 20:80的水:乙腈稀释制备咖啡因工作溶液(100 $\mu\text{g}/\text{mL}$)。取35 μL 的咖啡因工作溶液，用20:80的水:乙腈稀释至1 mL，制备3.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的咖啡因分析标准品。取5 μL 30%浓度的氢氧化铵溶液，在样品瓶中用18.2 M Ω 水稀释至500 μL ，得到0.3%氢氧化铵溶液。

制备流动相

利用IonHance乙酸铵浓缩液（pH 6.8，部件号：[186009705 < https://www.waters.com/nextgen/us/en/shop/standards--reagents/186009705-ionhance-ammonium-acetate-ph-68-concentrate.html>](https://www.waters.com/nextgen/us/en/shop/standards--reagents/186009705-ionhance-ammonium-acetate-ph-68-concentrate.html)）配制流动相。用水将浓缩液稀释100倍制得流动相A。流动相B为4:1流动相A:乙腈。

AMPcP，不使用色谱柱的方法条件

液相色谱条件

液相色谱系统：

ACQUITY Premier和ACQUITY UPLC H-Class PLUS Bio（配备二元溶剂管理器(BSM)）
ACQUITY Premier修改为部分非HPS的配置

检测器：

配备10 mm分析型流通池的TUV：260 nm，20 Hz

液相色谱条件

色谱柱:	用两通接头代替色谱柱
柱温:	30 °C
样品温度:	室温
进样体积:	1 µL
流速:	0.5 mL/min
流动相A:	水
流动相B:	乙腈
LC组成:	实验1 (仅AMPcP) 50:50 A:B 实验2 (AMPcP和咖啡因) 20:80 A:B

AMPcP/腺苷，使用色谱柱的方法条件

液相色谱条件

液相色谱系统:	ACQUITY Premier和ACQUITY UPLC H-Class PLUS Bio (配备二元溶剂管理器(BSM))
检测器:	配备10 mm分析型流通池的TUV: 260 nm, 40 Hz
色谱柱:	ACQUITY Premier HSS T3色谱柱, 1.8 µm, 2.1 mm x 50 mm (部件号: 186009467)
柱温:	35 °C

液相色谱条件

样品温度：	10 °C
进样体积：	1 μ L
流速：	0.5 mL/min
流动相A：	10 mM乙酸铵，溶于99.8:0.2的水:乙腈中（将IonHance浓缩液稀释100倍）
流动相B：	8 mM醋酸铵，溶于79.8:20.2的水:乙腈中

梯度

时间 (min)	流速 (mL/min)	%A	%B	曲线
0	0.5	95	5	-
0.2	0.5	95	5	6
0.8	0.5	5	95	6
1.9	0.5	5	95	6
2	0.5	95	5	6
3	0.5	95	5	6

数据管理

MS软件： MassLynx 4.2版，SCN 1001

结果与讨论

一直以来，核苷酸都是液相色谱分离方法难以回收的一种分析物。因此，ATP等分子是考虑用作测试探针的合理选择，但是，如上文所述，这种分析物容易发生水解。一项有关ATP冻干量的强制降解研究确认了这一点。对40 °C条件下温育的ATP样品进行色谱检测，结果显示在10天内发生明显降解，表明当储存温度低于0 °C时，可能在三个月内发生降解（图1A和1B）。因此，我们使用不可水解的核苷酸作为测试探针进行考察，结果显示，在40 °C条件下温育69天后，该探针未发生降解（图1C和1D）。该分子的化学结构是5'-(α,β -亚甲基)二磷酸腺苷(AMPcP)，如结构1所示。AMPcP由于携带富电子的磷酸基团而易于吸附至裸露的金属位点，因此可作为理想的探针化合物评估可能用作结合位点的裸露金属表面。实际上，在并行测试中发现AMPcP吸附至金属筛板的作用强度与ATP一样（图2）。采用在线钛制筛板将10 ng化合物连续进样10次时，ATP和AMPcP的平均回收率分别为1.6%和0.7%。该筛板测试利用的流动相为10 mM乙酸铵(pH 6.8)，流速为0.2 mL/min。研究制备了两种形式的AMPcP质量控制标准品，其中一种仅使用AMPcP，另一种为AMPcP与腺苷的等摩尔混合制剂。后一种制剂中包含阴性对照探针（腺苷），以便能够在检测方法中应用分离手段通过比率比较两种组分的峰面积。

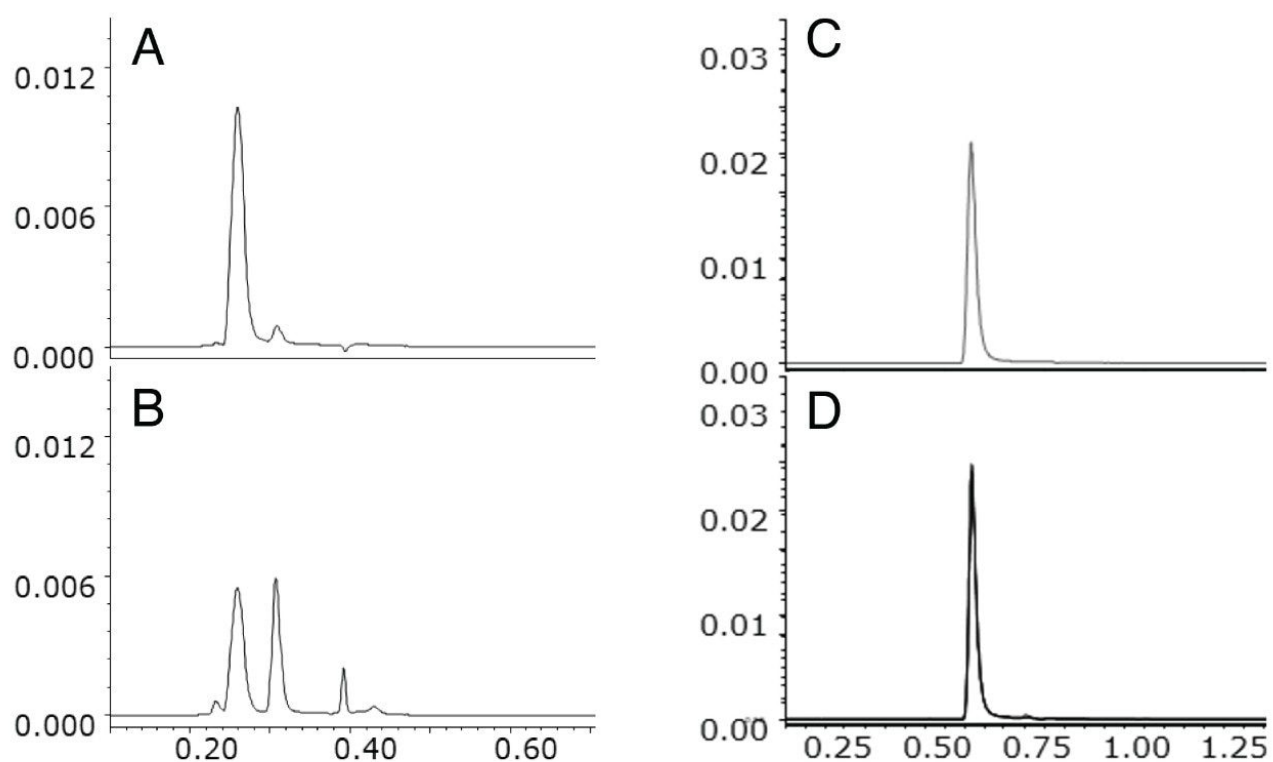


图1.AMPcP不易发生水解。堆叠色谱图，(1A)和(1B)分别表示ATP标准品在40 °C条件下温育10日之前和之后的情况，(1C)和(1D)分别表示AMPcP在40 °C条件下温育69日之前和之后的情况。

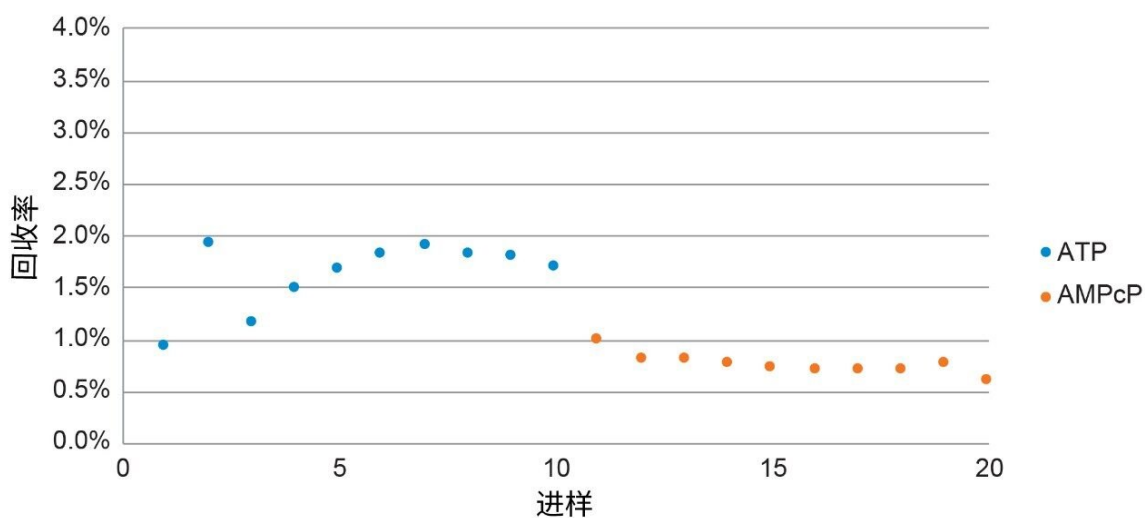
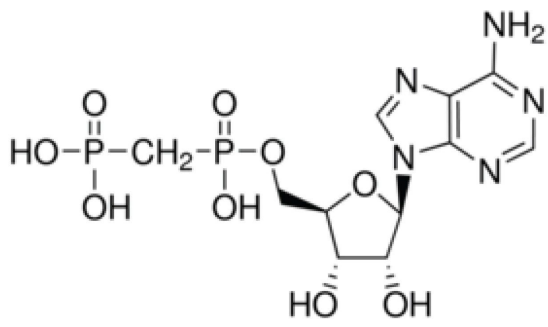


图2.AMPcP与ATP一样对金属吸附敏感。采用在线钛制筛板得到的峰面积回收率图，确认AMPcP的金属敏感性与ATP相当或更高。使用10 mM乙酸铵(pH 6.8)作为流动相，在0.2 mL/min的流速下依次将ATP（蓝色）和AMPcP（橙色）连续进样10次。

有一种研究液相色谱设备惰性的方法是，使用Waters Premier AMPcP标准品（仅含AMPcP）在不用色谱柱的情况下通过UV检测器进行重复进样分析。将金属敏感化合物进样至金属材质的仪器后，不同进样之间的重现性通常较差，特别是峰面积和峰高变化以及分析物信号总体减弱。因此，可以通过检查峰面积、峰高和峰面积（或峰高）的%RSD来确定是否存在金属表面。差异性程度取决于许多因素，其中包括待分析的具体化合物、系统历史、流动相等。图3展示了Waters Premier AMPcP标准品在ACQUITY Premier系统与配备全新流路的ACQUITY UPLC H-Class PLUS Bio系统上重复进样的结果。



5'-(α,β -亚甲基)二磷酸腺苷(AMPcP)。

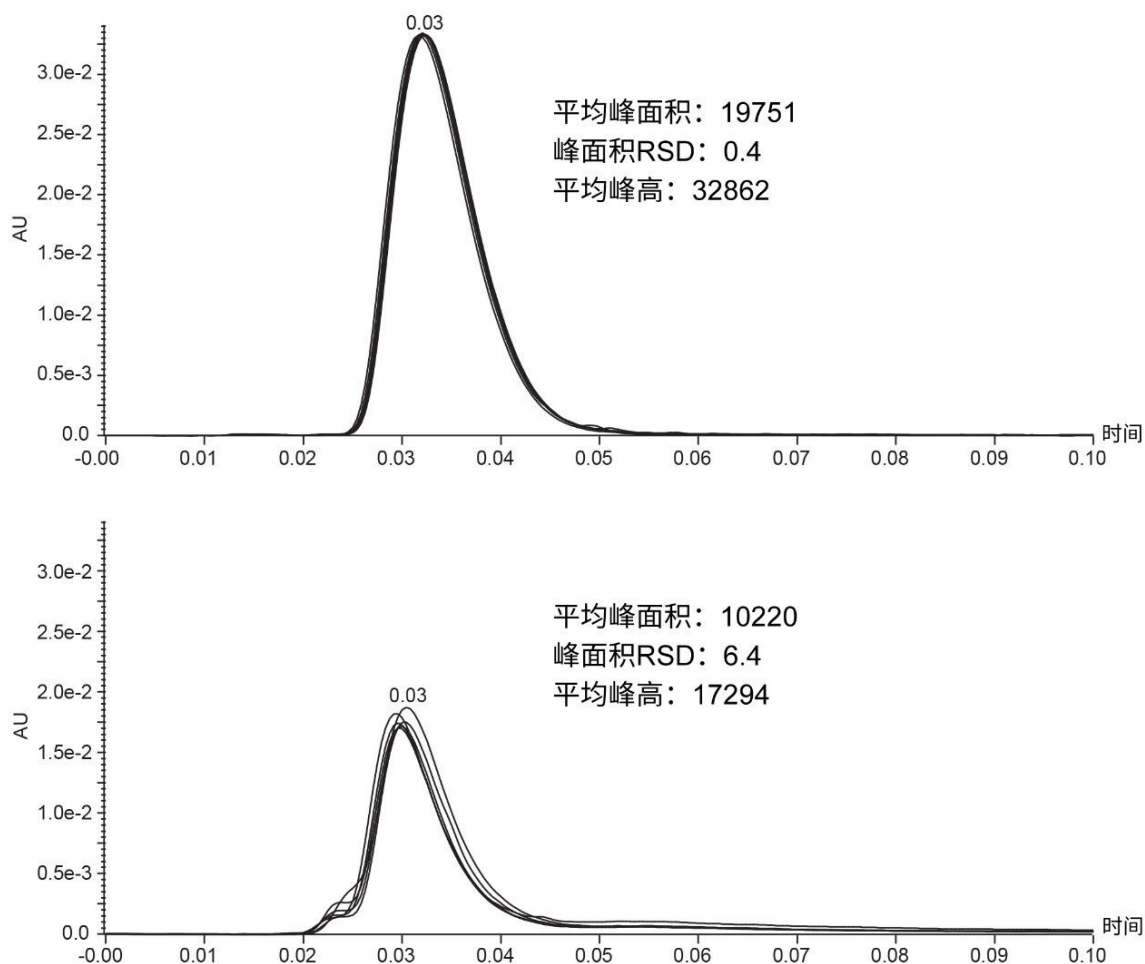


图3.1 μL AMPcP在ACQUITY Premier系统上重复进样六次所得到的叠加图（上图）与 $1 \mu\text{L}$ AMPcP在ACQUITY UPLC H-Class PLUS Bio系统上重复进样六次所得到的叠加图（下图）。

正如预期所料，当AMPcP进样至金属流路时，峰面积和峰高明显降低，分别降低48%和47%。此外，采用金属材料质的生物兼容性系统所得到的峰面积RSD为6.4%，而采用惰性ACQUITY Premier系统所得到的峰面积RSD仅为0.4%。在ACQUITY Premier系统中观察到峰面积重现性明显改善是因为分析物与金属的相互作用减少。具有裸露金属表面的系统还会导致重复进样过程中的峰面积增加，因为与金属相互作用的分析物会吸附至裸露金属表面，使金属被部分掩盖，导致后续测量的回收率提高。因此，具有裸露金属表面的系统更容易产生差异性，并且更加难以管控分析物回收率。这些影响在图4中很明显，其中ACQUITY Premier系统部分配备了HPS部件。在六次重复进样0.3%的氨溶液后，分别重复进样AMPcP和咖啡因四次并完成分析。进样氢氧化铵可以对系统历史效果进行基线化，从而提高系统适应性和故障排除检查的有效性。而且，将流动相中的有机物(ACN)含量增加到80%，会显

著增加AMPcP对暴露金属表面的敏感性。根据AMPcP的峰面积相对标准偏差从1.6%增加到8.0%的测量结果，确定了暴露的金属表面。此外，咖啡因的相对标准偏差没有出现显著的变化，在这两种条件下，咖啡因的相对标准偏差均为0.5%。此外，观察到峰发生了显著变化，引入非HPS系统组件后，峰面积比（AMPcP相对于咖啡因）从0.98降低到了0.42。本例不仅突显了使用惰性液相色谱系统的优势，还展示了进样标准品的重要性，以便在分析金属敏感化合物样品之前确定系统适应性。

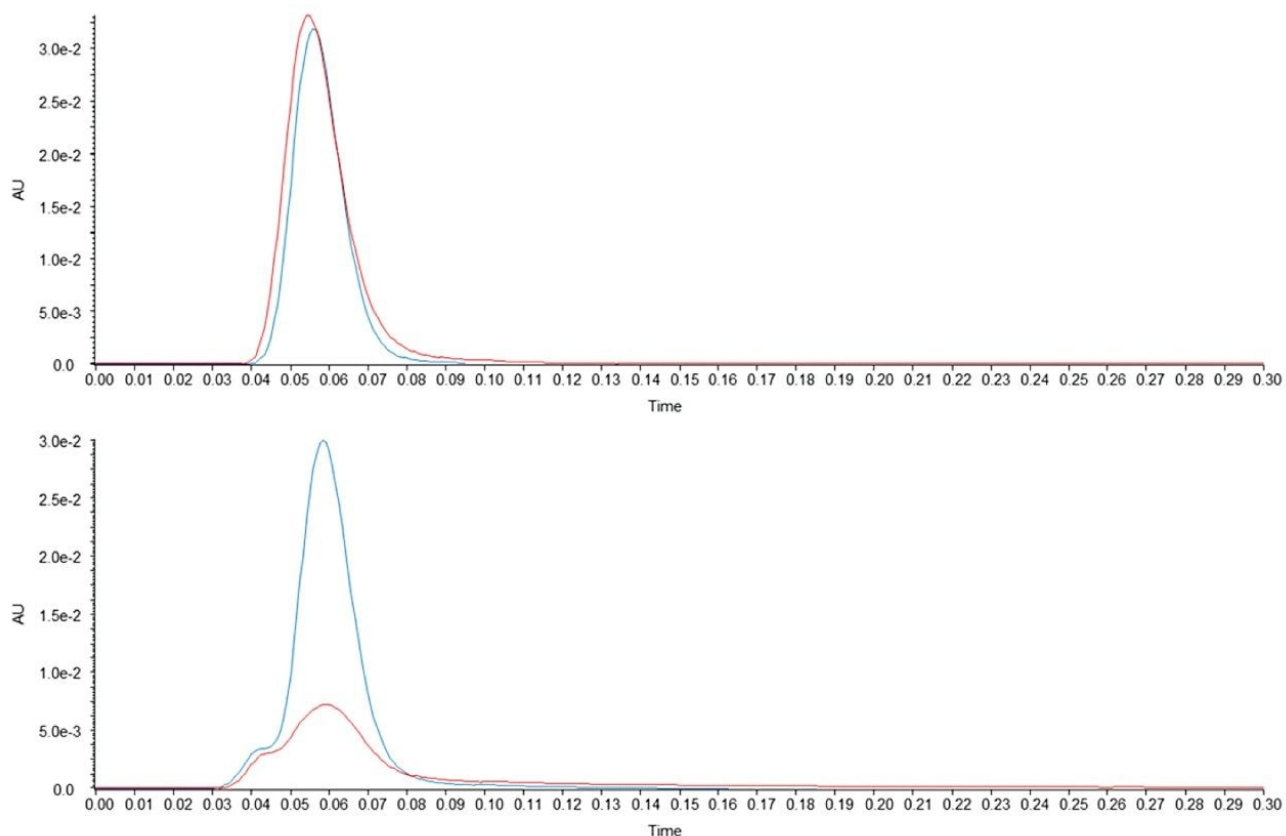
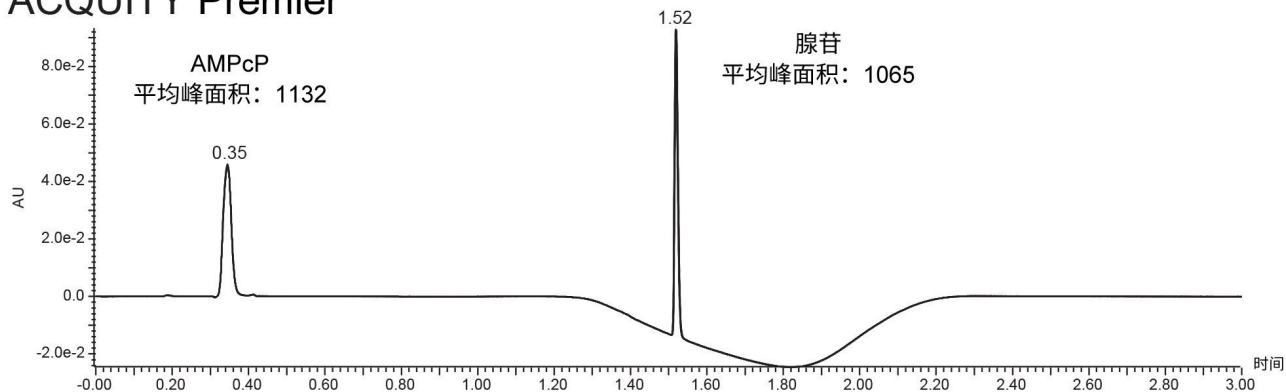


图4.AMPcP和咖啡因标准品分别在具有完全（上图）和部分（下图）HPS系统组件的ACQUITY Premier系统上重复进样四次得到的叠加图。AMPcP迹线以冷色（蓝色、绿色和青色）表示，咖啡因迹线以暖色（紫色、红色和粉色）表示。条件：流速为0.5 mL/min的20% 18.2 MΩ水/80%乙腈(v/v)，30°C。在重复进样六次0.3%氢氧化铵溶液并用规定的流动相和流速平衡两分钟后，对AMPcP和咖啡因重复进样进行分析。

除使用金属敏感化合物评估系统准备状态以外，也可以使用包含非金属敏感化合物的系统适应性样品发挥其他优势。腺苷的基本分子结构与AMPcP相同，但缺少任何会吸附至金属表面的磷酸基团。因此，腺苷可用于评估系统的整体健康状况和性能，而AMPcP可用于评估任何潜在的金属结合作用。也就是说，腺苷可用作结构相似的阴性

对照化合物。以下示例将AMPcP/腺苷混合样品重复进样至ACQUITY Premier系统和包含生物兼容性流路（主要由钛和MP35N制成）的ACQUITY UPLC H-Class PLUS Bio系统中（图5）。该样品中各组分的摩尔量相等，因此，在不存在系统吸附损失的情况下，预期LC-UV测量所得到的峰面积相当。对于具有裸露金属表面的系统，发现AMPcP与腺苷的峰面积比小于1.0。未检出AMPcP，但是仍检测到腺苷，表明样品流路中存在大量的裸露金属。腺苷的测量结果排除了由其他原因（例如进样失败或样品制备不当）引起的信号丢失。

ACQUITY Premier



ACQUITY UPLC H-Class PLUS Bio

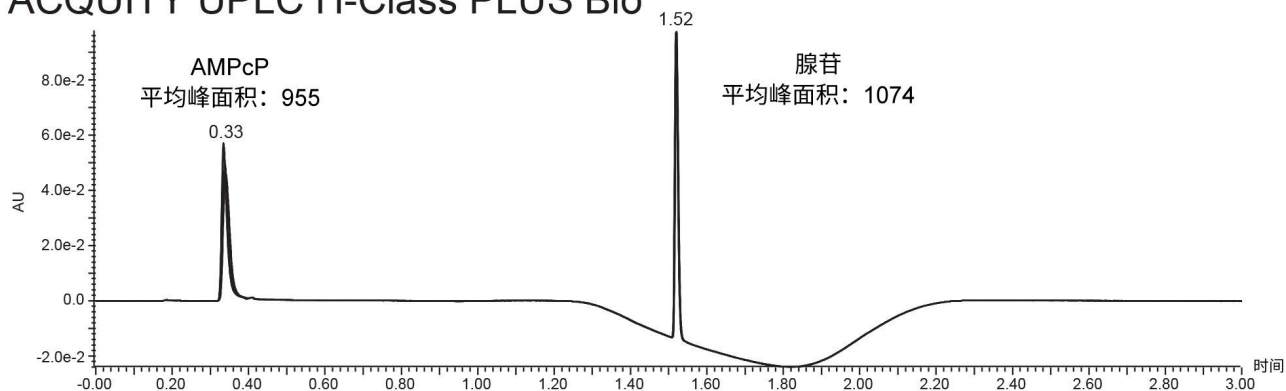


图5.AMPcP和腺苷混合物标准品在ACQUITY Premier系统上重复进样五次所得到的叠加图（上图）与在ACQUITY UPLC H-Class PLUS Bio系统上重复进样五次所得到的叠加图（下图）。

正如预期所料，这些结果表明，惰性ACQUITY Premier系统与包含金属的生物兼容性系统相比，AMPcP的峰面积显著增加(16%)。相比之下，非金属敏感性化合物腺苷在两套系统上表现出相当的峰面积，差异仅为1%。腺苷峰的保留时间和峰面积重现性非常高，表明系统组件（泵、自动进样器、进样器和检测器）的性能均正常。这一结

果表明，混合样品能够突显任何潜在的金屬吸附作用，有助于快速显示总体LC性能。

结论

确认仪器正常运行是实施任何分析测量的关键。系统适应性测试有助于增加结果确定度。本研究以近期推出的ACQUITY Premier系统为对象展示了惰性评估方法，该系统旨在避免金属与分析物之间发生次级相互作用。基于此目的，采用不可水解的ADP类似物（称为AMPcP）作为一种新型Waters Premier标准品。将高度稳定的分子配制成Waters Premier AMPcP标准品以及Waters Premier AMPcP和腺苷混合物标准品。使用仅含AMPcP的标准品进行一系列无色谱柱进样后，与采用金属合金的ACQUITY UPLC H-Class PLUS Bio系统相比，利用ACQUITY Premier系统可以获得更一致的回收率。还证明了能够将仅含AMPcP的标准品与咖啡因标准品配对作为阴性对照，该方法成功地识别了当特意加入了一些暴露的金属表面时ACQUITY Premier系统中的金属暴露。同时，使用ACQUITY Premier色谱柱对Waters Premier AMPcP和腺苷混合物标准品进行色谱分离，可以检测两种液相色谱仪器之间的相对回收率差异。这些体现AMPcP测量性能改善的示例证明，ACQUITY Premier技术在分析与金属相互作用的其他化合物方面具有优势。

参考资料

1. Lauber, M.; Walter, T. H.; Gilar, M.; DeLano, M.; Boissel, C.; Smith, K.; Birdsall, R.; Rainville, P.; Belanger, J.; and Wyndham, K. Low Adsorption HPLC Columns Based on MaxPeak High Performance Surfaces. Waters Application Note, 2020, [720006930EN < https://www.waters.com/waters/library.htm?cid=511436&lid=135074404>](https://www.waters.com/waters/library.htm?cid=511436&lid=135074404) .

致谢

本文作者由衷感谢Koley Hall制备了Waters Premier标准品，并感谢Baiba Cabovska、Kim Haynes和Jim Karafilidis对本文所做的审阅和编辑。

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)

[ACQUITY UPLC H-Class PLUS Bio系统 <https://www.waters.com/10166246>](https://www.waters.com/10166246)

[ACQUITY UPLC PDA检测器 <https://www.waters.com/514225>](https://www.waters.com/514225)

[MassLynx MS软件 <https://www.waters.com/513662>](https://www.waters.com/513662)

720007105ZH, 2021年3月修订

© 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