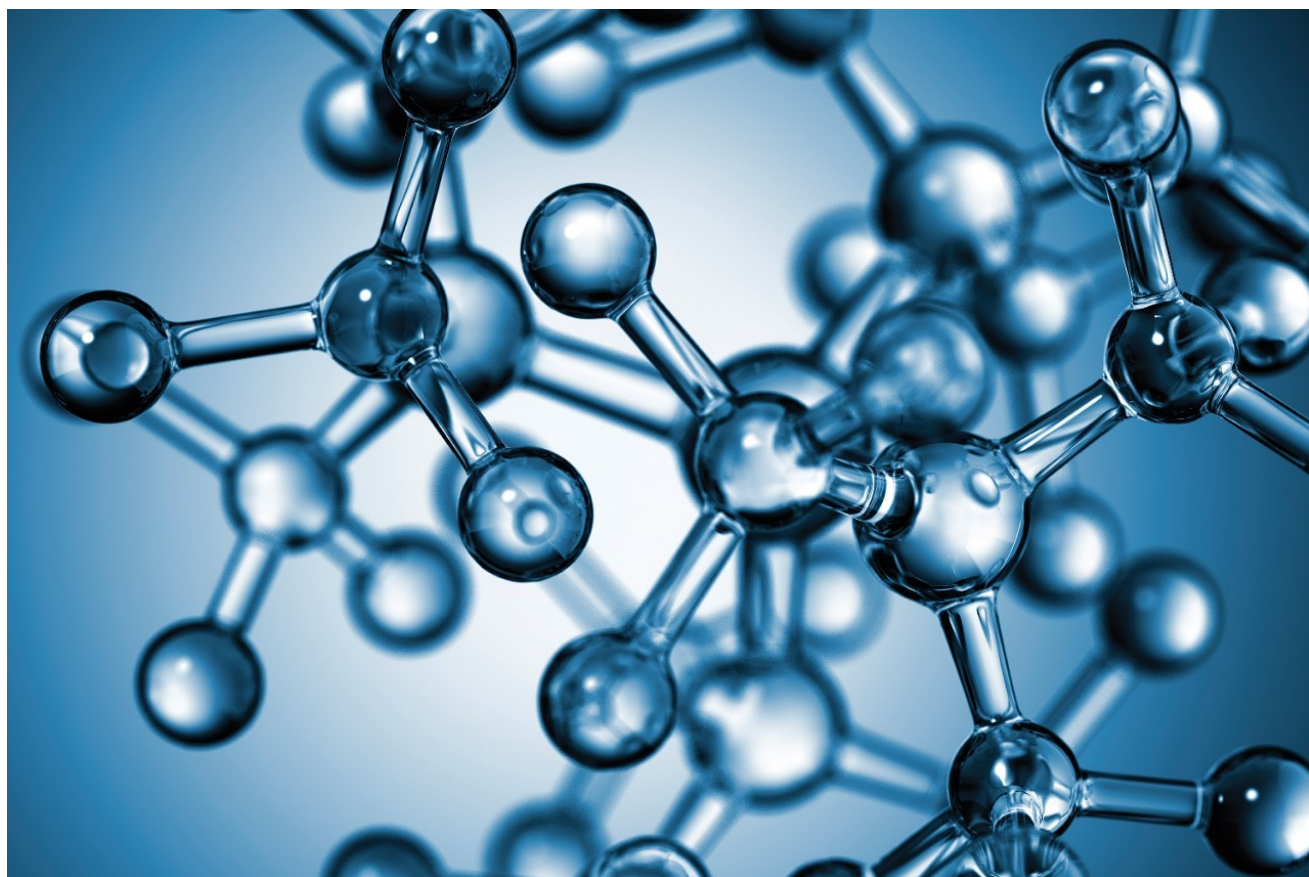


利用Arc Premier解决方案提高金属敏感分析物的回收率：系统间重现性以及常规液相色谱的多系统比较

Will Martin, Dhvani Shah, Chris Grzonka, Anthony Dovell, Zhimin Li, Paula Hong, Iva Turyan, Jason Dyke

Waters Corporation



摘要

由于金属敏感化合物会与金属表面相互作用，使用常规液相色谱技术分析此类化合物可能极具挑战性且非常耗时。沃特世推出一套采用MaxPeak高性能表面(HPS)技术的常规工作流程解决方案，可有效减少因金属相互作用而引起的非特异性吸附损失，其最初随ACQUITY Premier解决方案推出，现在可以在Arc Premier系统上使用。Arc Premier解决方案将ACQUITY Arc的坚固耐用性与MaxPeak技术优势集为一体，可提高金属敏感化合物的回收率。最终获得可重现的系统间HPLC性能，且无需为减少上述相互作用而进行耗时的系统准备或方法修改。

本研究使用可与金属表面相互作用的磷酸化化合物测试Arc Premier解决方案，以评估系统间性能。结果证明，Arc Premier解决方案对各种化合物（包括金属敏感分析物）都能发挥出色的系统间重现性。此外还比较了Arc Premier解决方案与常规液相色谱技术的性能，所有研究均采用多套系统。数据分析结果证明，Arc Premier解决方案与常规液相色谱技术相比，在金属敏感化合物分析中具有统计学差异。

优势

- Arc Premier解决方案可为金属敏感化合物分析提供出色的系统间重现性
- MaxPeak HPS技术可提高低浓度金属敏感分析物的回收率
- 与常规不锈钢液相色谱技术相比，Arc Premier解决方案对金属敏感化合物表现出更高的性能

简介

金属敏感化合物（例如磷酸化化合物）对常规液相色谱提出了独特挑战，包括回收率不佳、结果重现性差和精密度低。过去解决这些分析挑战的策略包括钝化或在流动相中使用离子对试剂。前者非常耗时且需要执行多个冲洗步骤来准备系统以供分析，而后者可能需要重新开发方法并且与多种检测技术不兼容。这两种情况下，系统间重现性都可能受到系统准备或流动相配制的影响。

为应对这些挑战，沃特世推出了Arc Premier解决方案。该解决方案由高通量HPLC技术与采用MaxPeak HPS技术的ACQUITY Arc组成，HPLC技术已针对沃特世率先推出的2.5 μm 颗粒填料优化，旨在提供一款可兼容金属敏感化合物的高重现性系统。本研究将执行系统间研究，以评估Arc Premier解决方案与常规液相色谱技术对各种分析物的重现性。使用t检验进行数据分析以证明研究的统计学意义。

实验

方法1：腺苷、二磷酸腺苷、三磷酸腺苷

样品描述

用95/5流动相A:流动相B分别制备腺苷(Acros)、二磷酸腺苷(ADP) (Sigma/Aldrich)、三磷酸腺苷(ATP) (Acros)的储备液（浓度2 mg/mL）。通过连续稀释原料混合物来制备校准品和样品。样品和标准品的浓度为0.2~200 μ g/mL。

方法条件

液相色谱系统：	Arc Premier QSM-R、Arc Premier FTN-R、MaxPeak柱温箱 - 主动和常规液相色谱系统
检测器：	Arc Premier 2489 UV/Vis或Arc Premier 2998 PDA
波长：	260 nm
色谱柱：	Arc Premier解决方案：XSelect Premier HSS T3 XP, 2.5 μ m, 4.6 $\times$ 50 mm（部件号：186009858） 常规液相色谱柱：XSelect HSS T3 XP, 2.5 μ m, 4.6 $\times$ 50 mm（部件号：186006157）
柱温：	40 °C
样品温度：	10 °C
进样体积：	15 μ L
流速：	1.5 mL/min
流动相A：	8 mM乙酸铵，pH 6.8，溶于99.8%水和0.2%乙腈中
流动相B：	6.4 mM乙酸铵，pH 6.8，溶于79.8%水和20.2%乙腈中

梯度：1%流动相B保持0.2 min，然后在7 min内梯度增加至95%。

方法2：磷酸氢化可的松、地塞米松、磷酸地塞米松、醋酸地塞米松

样品描述

磷酸氢化可的松三乙胺、地塞米松磷酸钠、地塞米松和醋酸地塞米松标准品购自Sigma Aldrich。用50/50水:乙腈制备磷酸氢化可的松和地塞米松磷酸钠浓度分别为2 mg/mL、地塞米松和醋酸地塞米松浓度分别为0.6 mg/mL的混合储备液。通过连续稀释原料混合物来制备校准品和样品。所示样品中磷酸氢化可的松和地塞米松磷酸钠的浓度为25 µg/mL，地塞米松和醋酸地塞米松的浓度为7.5 µg/mL。

液相色谱系统：Arc Premier QSM-R、Arc Premier FTN-R、MaxPeak柱温箱 - 主动和吸光度检测器（2489或2998）。常规系统

检测器：Arc Premier 2489 UV/Vis或Arc Premier 2998 PDA

波长：260 nm

色谱柱：Arc Premier解决方案：XBridge Premier BEH C₁₈, 2.5 µm, 4.6 × 50 mm（部件号：186009847）
常规液相色谱柱：XBridge BEH C₁₈, 2.5 µm, 4.6 × 50 mm（部件号：186006037）

柱温：40 °C

样品温度：10 °C

进样体积：30 µL

流速：1.5 mL/min

流动相A:	10 mM甲酸铵水溶液，pH 3.0
流动相B:	乙腈
梯度:	18%流动相B保持3 min，然后在4 min内梯度增加至50%。

结果与讨论

许多化合物都会与金属表面发生相互作用。为应对这些挑战，过去曾采用过多种方法，包括系统钝化/活化或使用含有离子对试剂的流动相。Arc Premier解决方案利用MaxPeak涂层来减少这些相互作用并提高回收率，无需使用上述任一种方法。

下列研究（包括统计分析）将展示这些难分析分析物的系统间重现性。下列研究中使用的三套Arc Premier QSM-R系统已经过各种化合物（图1）测试，其中有些化合物含有可能与金属表面相互作用的基团。所有测试的流动相都不会影响这种相互作用，即未使用离子对试剂。每套系统上的每次测试都包括100多次进样。每套系统上执行的分析为：ATP、ADP连续进样36次；其他化合物在3天内进样36次。得到的校准曲线数据代表各浓度样品在三套系统上执行6次重复测定的合并结果。对Arc Premier系统和常规液相色谱系统进行多系统(n=3)比较测试。

本文所述研究中分析的金属敏感化合物分别含有磷酸基团，或为会与金属表面带电物质相互作用的带正电分析物。为探究化学结构对相互作用的影响，还测试了磷酸基团数量不断增加的化合物（包括ADP和ATP）。此外，利用非磷酸化类似物（腺苷和地塞米松）进行对照研究。

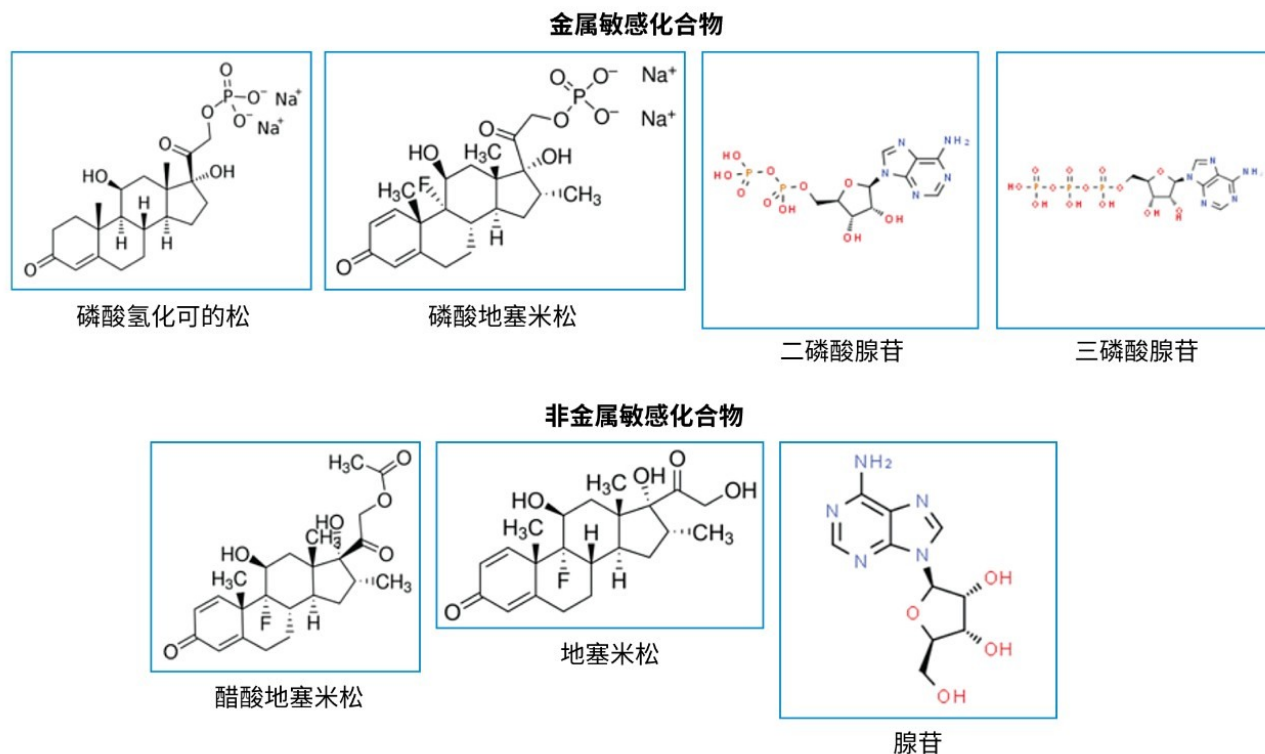


图1.ACQUITY Arc Premier解决方案和常规液相色谱技术所测化合物的化学结构

Arc Premier解决方案：系统间重现性

为考察Arc Premier解决方案的系统间重现性，比较了各种分析物的峰面积。如上所述，每组数据代表每套系统上36次进样（ATP和APD采取连续进样方式，其他化合物在3天内完成进样）的结果。比较每套系统上金属敏感化合物的峰面积（图2），结果显示每套系统获得了高精密度且不相上下的结果。具体而言，每套系统对任一分析物的%RSD均不超过0.28%，证明具有出色的精密度。每种磷酸化化合物的平均峰面积相当，所有金属敏感化合物的相对标准偏差在0.9~2.2%的范围内。考虑到进样次数(36)和研究持续时间，这些结果证明Arc Premier解决方案具有出色的精密度和稳定一致的系统间性能。

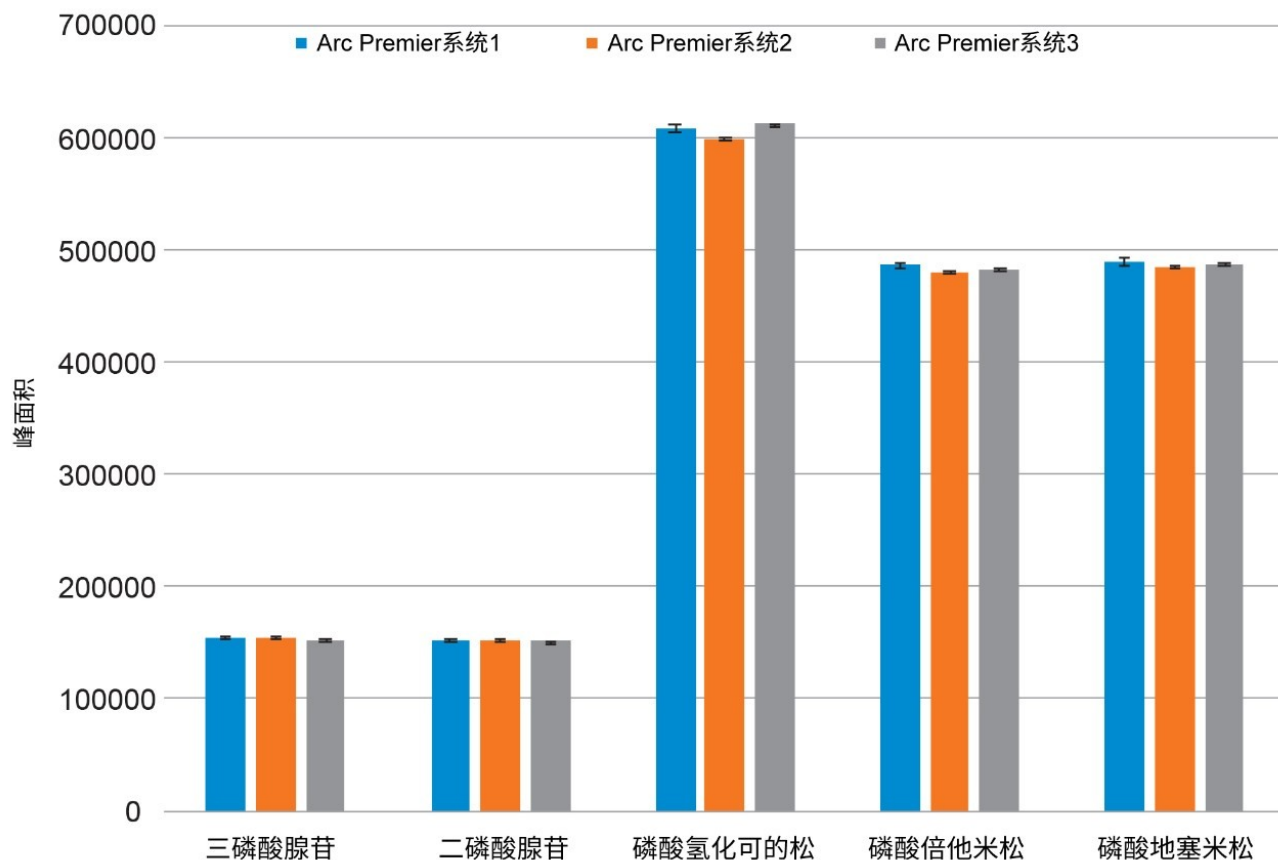


图2.3套Arc Premier QSM-R系统间金属敏感化合物的峰面积比较。每套系统均执行36次进样分析。标准误差条柱表示每套系统 ± 3 倍标准偏差(σ)。

为确保非金属敏感化合物不受影响，还分析了对非磷酸化类似物的系统间重现性。如图3所示，Arc Premier解决方案对这些化合物也表现出优异的重现性。各系统上所有分析物在几天内36次进样分析的结果%RSD低于0.26%。此外，三套系统得到的平均峰面积相当，且相对标准偏差均在1%以内。这些结果表明，无论用于何种分析物，Arc Premier解决方案均可提供一致的系统间结果。

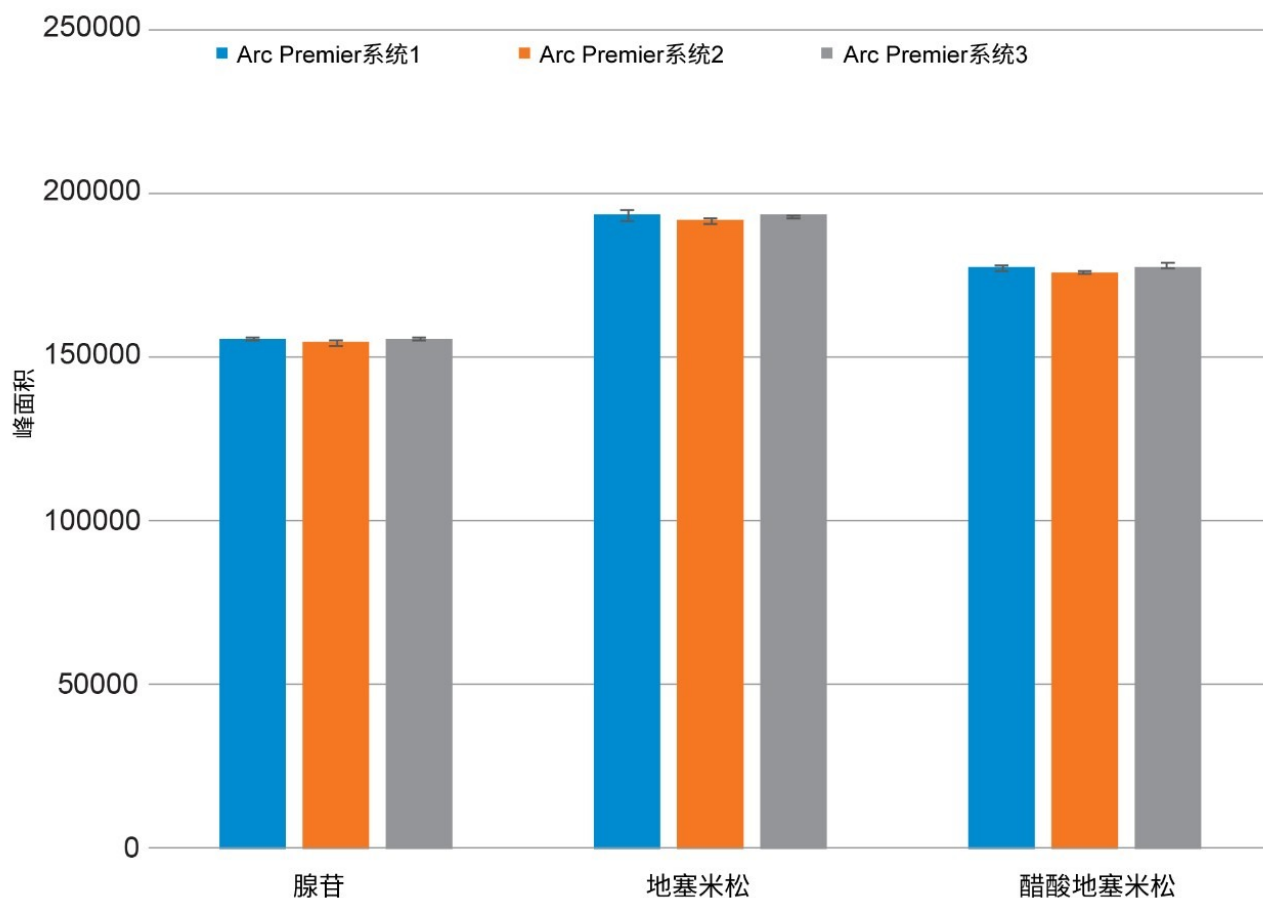


图3.3套Arc Premier QSM-R系统间非金属敏感化合物的峰面积比较。标准误差条柱表示每套系统 ± 3 倍标准偏差(σ)。

Arc Premier解决方案与常规液相色谱的多系统比较

除表现出一致的系统间性能外，Arc Premier解决方案对金属敏感化合物的分析相较于常规液相色谱系统具有更出色的性能¹。为进一步评价两种系统之间的差异，采用多套Arc Premier系统和常规液相色谱系统采集数据。所有数据均采用前述方式采集。

分析三套系统得到的平均峰面积以及峰面积标准偏差表明，Arc Premier解决方案与常规液相色谱系统之间存在明显差异（图4）。腺苷是一种通常不会与金属表面相互作用的分析物，当通过100次进样采集一组数据来比较3套系统得到的平均峰面积时，两组系统对这种分析物表现出相媲美的回收率。而ATP和ADP是两种会与金属表面相互作用的磷酸化化合物，在同一时间段内，在不使用系统钝化或在流动相中使用离子对试剂的情况下，峰面积得到显著改善。

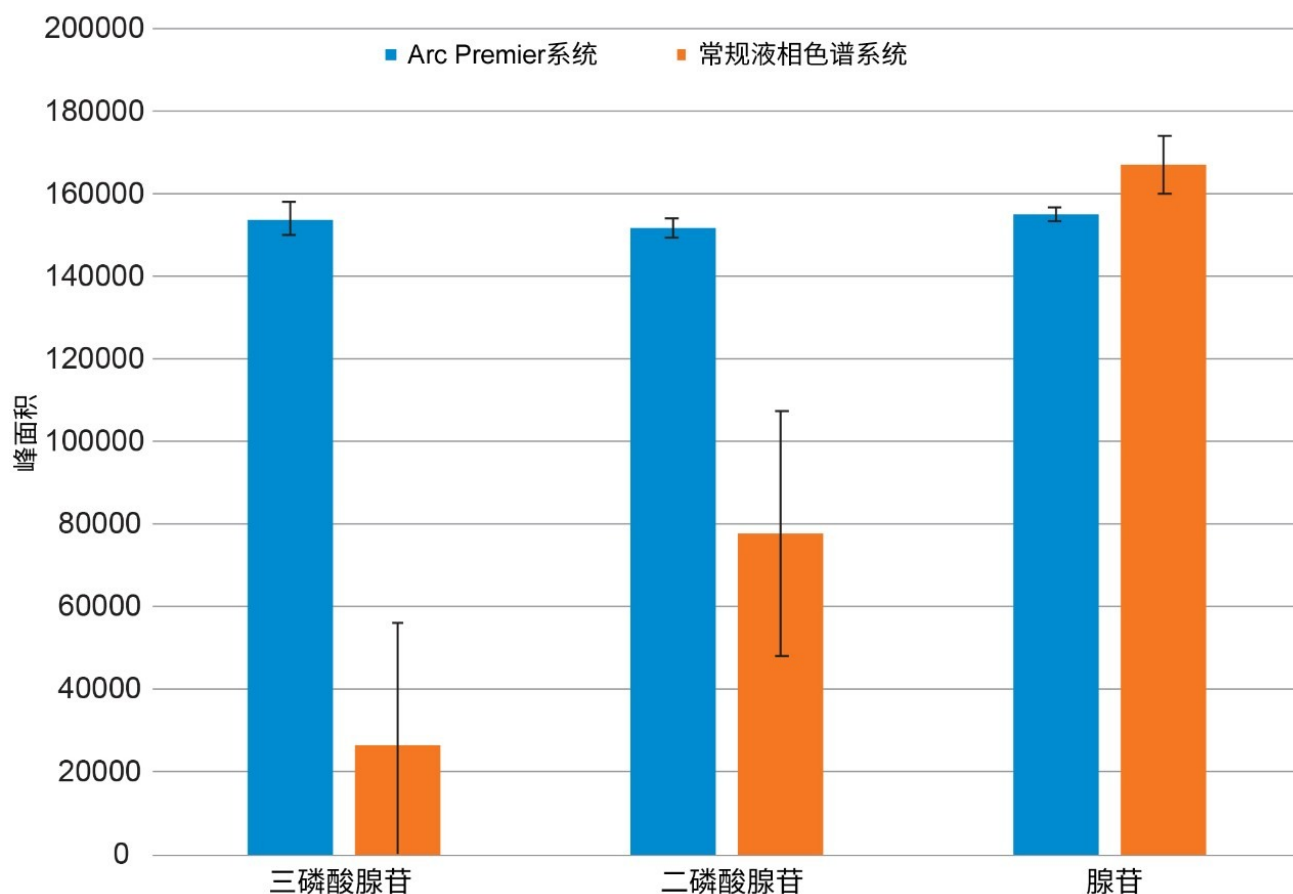


图4.Arc Premier系统（蓝色）和常规液相色谱系统（橙色）得到的三磷酸腺苷(ATP)、二磷酸腺苷(ADP)和腺苷平均峰面积比较。标准误差条柱表示每套系统 ± 3 倍标准偏差(3σ)。

相比之下，使用与金属相互作用的化合物比较响应因子或峰面积/浓度时，Arc Premier解决方案与常规液相色谱技术之间的差异非常明显（图5和图6）。值得注意的是，在常规液相色谱系统上，ATP和ADP校准曲线的低浓度点未产生任何可积分峰，常规液相色谱系统的LOQ比Arc Premier系统高得多。Arc Premier解决方案使ATP和ADP在1~200 $\mu\text{g/mL}$ 范围内的变化相对平稳，无需钝化或修改系统或使用复杂的离子对流动相。总体而言，所得数据表明，磷酸化合物在常规液相色谱系统上有所损失，可能是因为在金属表面发生了吸附。相比之下，Arc Premier系统在整个浓度范围内的响应因子变化很小。

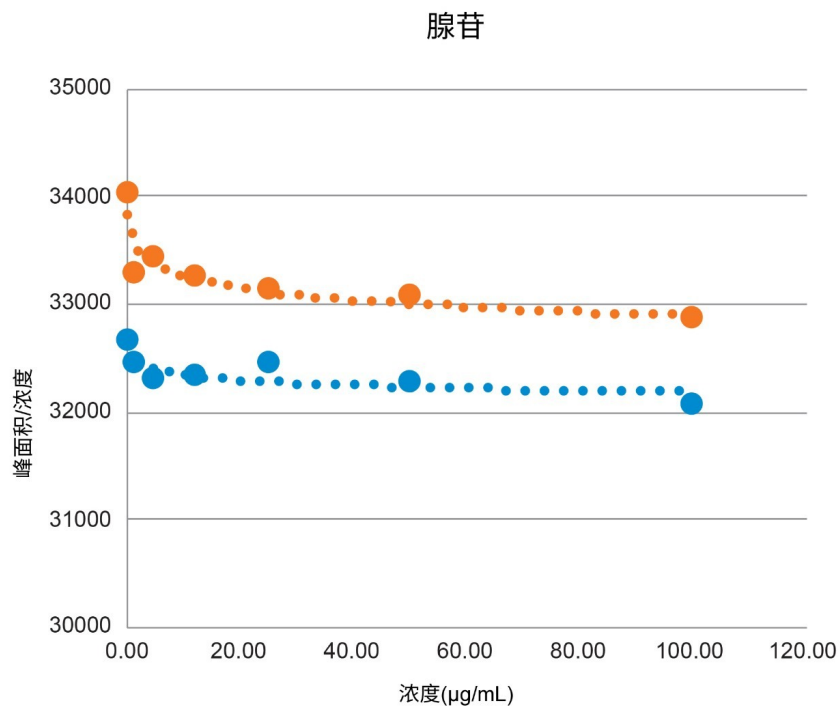


图5.在1~100 $\mu\text{g/mL}$ 校准范围内，3套Arc Premier系统（蓝色）和3套常规液相色谱系统（橙色）分析腺苷得到的平均响应因子

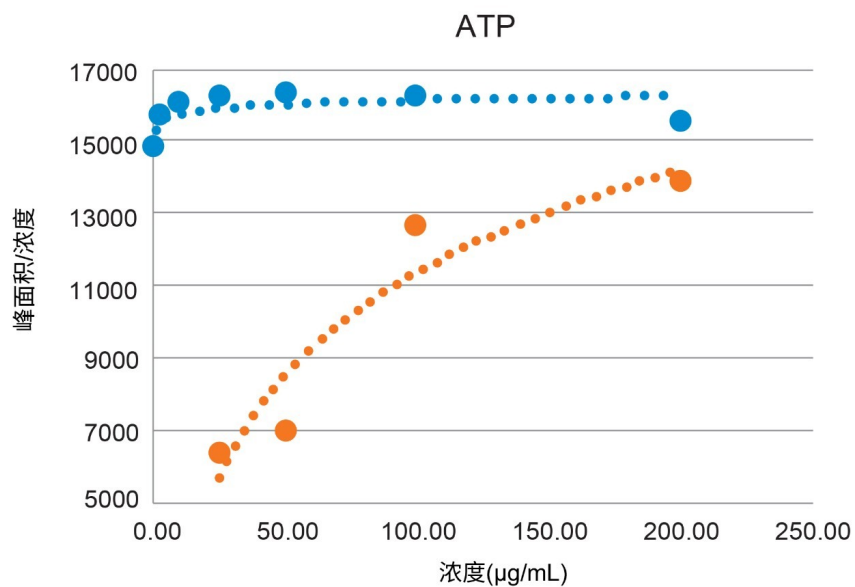


图6.在1~200 $\mu\text{g/mL}$ 校准范围内，3套Arc Premier系统（蓝色）和3套常规液相色谱系统（橙色）分析ATP得到的平均响应因子

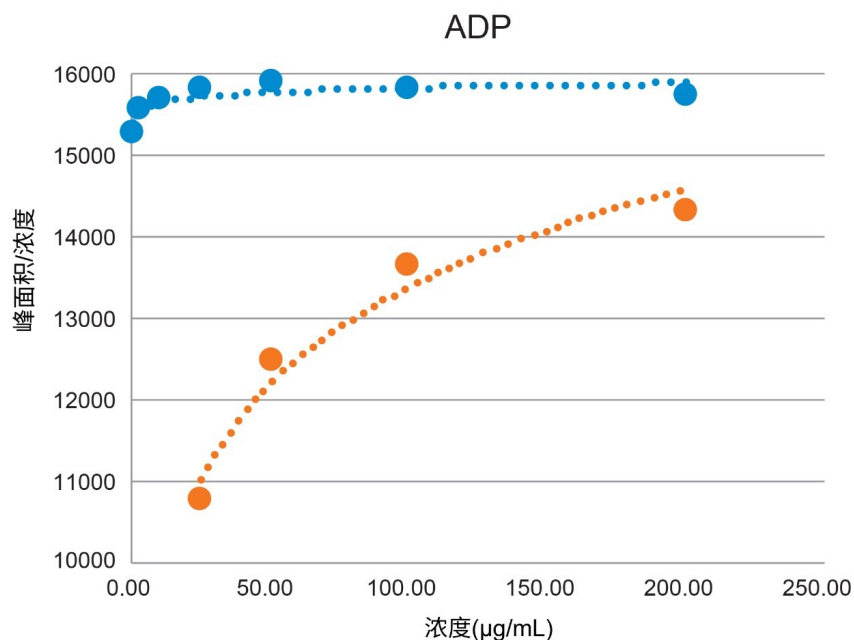


图7.在1~200 $\mu\text{g/mL}$ 校准范围内，3套Arc Premier系统（蓝色）和3套常规液相色谱系统（橙色）分析ADP得到的平均响应因子

Arc Premier与常规液相色谱的比较和统计分析

Arc Premier解决方案和常规液相色谱系统的合并数据分析显示，金属敏感化合物的系统间重现性存在显著差异。如上所述，所得数据代表每种类型三套被测系统的平均值。结果（表1）证明，不与金属相互作用的分析物（腺苷）具有出色的峰面积精密度，而对金属敏感的磷酸化化合物仅在Arc Premier解决方案上具有出色的性能。该解决方案分析金属敏感化合物的结果与常规液相色谱相比存在明显差异。例如，对ATP的精密度是常规液相色谱技术的63倍，对ADP的精密度是常规液相色谱技术的41倍。

分析物	Arc Premier解决方案	常规LC系统
腺苷	0.09%	0.07%
ATP	0.25%	15.77%
ADP	0.15%	6.07%

表1.Arc Premier系统和常规液相色谱系统分析磷酸化化合物得到的%RSD。每种类型取3套系统的平均值。执行t检验以评价Arc Premier系统和常规液相色谱系统得到的数据。分析结果表明，两种系统对ATP和ADP的精密度值存在统计学差异，Arc Premier解决方案的变异性明显低于常规系统，结果具有统计学意义。t检验P值见表

2。

参数	腺苷	ATP	ADP
峰面积	0.800	2.330×10^{-22}	8.295×10^{-21}
峰面积%RSD (精密度)	6.609×10^{-3}	1.058×10^{-5}	1.999×10^{-4}

表2.比较3套Arc Premier系统与3套常规液相色谱系统的t检验P值

比较Arc Premier系统与常规液相色谱系统的系统间重现性时，观察到类似的趋势，如上所述。对于金属敏感化合物（ATP和ADP），在比较多套系统时，Arc Premier解决方案提供了优异的精密度值，三套系统之间的相对标准偏差低于5%，而常规液相色谱技术的%RSD为12~38%（表3）。分析金属敏感化合物时，Arc Premier解决方案对ATP的精密度是常规液相色谱的8.6倍，对ADP的精密度是常规液相色谱的3.5倍。这些结果表明，Arc Premier解决方案对于这些难分析的金属敏感化合物具有出色的性能。

分析物	Arc Premier解决方案	常规LC系统
ATP	4.39%	37.92%
ADP	3.67%	12.73%

表3: 3套Premier系统和3套常规系统分析25 µg/mL分析物所得所有峰的总%RSD。取每种系统上150次进样的合并值。

结论

Arc Premier解决方案表现出优异的系统间重现性，同时在分析对金属敏感的磷酸化化合物时，相对于常规液相色谱系统提供了更高的精密度和灵敏度。如前所述，对于金属敏感化合物，在多套Arc Premier系统上观察到的精密度和峰面积均高于常规液相色谱系统。低浓度分析物的峰面积差异最为显著，采用常规液相色谱技术时发生的吸附显著影响了分析物回收率。所得数据表明，Arc Premier解决方案能够在多次进样中为各种分析物始终提供可重现的结果，同时也使分析人员对系统间重现性足以确保每套系统提供相同的结果充满信心。

参考资料

1. Zhimin Li, Z.; Shah, D.; Dovell, A.; Martin, A., Grzonka, Chris; Dyke, J. 直面挑战：Arc Premier系统提高难检化合物的灵敏度和重现性, 沃特世应用纪要, [720007267ZH <https://www.waters.com/nextgen/us/en/library/application-notes/2021/challenge-accepted-arc-premier-system-increases-sensitivity-and-reproducibility-for-hard-to-see-compounds.html>](https://www.waters.com/nextgen/us/en/library/application-notes/2021/challenge-accepted-arc-premier-system-increases-sensitivity-and-reproducibility-for-hard-to-see-compounds.html), 2021年6月.

特色产品

- [Arc Premier系统 <https://www.waters.com/waters/nav.htm?cid=135083359>](https://www.waters.com/waters/nav.htm?cid=135083359)
- [Empower色谱数据系统 <https://www.waters.com/10190669>](https://www.waters.com/10190669)
- [ACQUITY UPLC可变波长紫外检测器 <https://www.waters.com/514228>](https://www.waters.com/514228)

720007330ZH, 2021年8月



© 2021 Waters Corporation. All Rights Reserved.