

通过抑制金属吸附提高核苷酸分析重现性和定量准确性

藤村 大树、安藤 惠美子、铃木 里沙

特点描述

- ◆ 可抑制含磷酸基团化合物的金属吸附，采集峰形良好及峰面积重复性好的数据。
- ◆ 可高灵敏度、高精密度分析低浓度的磷酸基团化合物。
- ◆ 不需要进行酸清洗、添加螯合剂、使用高浓度样品进行掩盖，Nexera XS inert 可缩短分析时间和减少样品消耗。

简介

通常用于 HPLC 流路管线的不锈钢兼具优异的耐压性、耐腐蚀性，但由于是金属，会与具有磷酸基团的化合物产生相互作用，经常引起峰形变差和强度降低。为抑制此金属吸附，会使用磷酸等进行流路清洗、添加螯合剂、使用高浓度样品进行掩盖。但是，即使采取此类处理方式，仍难以获得高重现性的分析结果。

本文介绍了“无金属流路”的超高效液相色谱仪“Nexera XS inert”系统，以及在不锈钢色谱柱内表面包覆有 PEEK 材料的“无金属色谱柱”，此系统分析核苷酸等具有磷酸基团的化合物时有很好的金属吸附抑制效果。

样品及分析条件

将含磷酸基团的单磷酸腺苷 (AMP)、二磷酸腺苷 (ADP) 和三磷酸腺苷 (ATP) 作为样品，全部用水溶解、稀释。评价金属吸附的影响，我们比较色谱仪和色谱柱的两个组合方式，一个是含金属的系统，另一个是无金属系统，如表 1 所示。分析条件如表 2 所示。

表 1 系统组成

	色谱仪	色谱柱
金属流路	Nexera XS	Shim-pack™Scepter C18-120
无金属流路	Nexera XS inert	Shim-pack Scepter C18-120 [无金属]

表 2 分析条件

系统	: Nexera XS inert Nexera XS
色谱柱	: Shim-pack Scepter C18-120 [无金属] ^{*1} (100 mm×2.1 mm 内径, 3 μm) Shim-pack Scepter C18-120 ^{*2} (100 mm×2.1 mm 内径, 3 μm)
流动相	: 乙腈/10 mmol/L 甲酸铵溶液 = 0.5: 99.5
流速	: 0.2 mL/min
柱温	: 40 °C
样品瓶	: TORAST™-H 玻璃瓶 (岛津 GLC) ^{*3}
进样体积	: 2 μL
检测波长	: 254 nm (SPD-M40, UHPLC 惰性流通池)

*1 P/N 227-31073-02, *2 P/N 227-31014-05, *3 P/N 370-04350-00

峰形及峰面积重复性的比较

AMP、ADP、ATP 的混合标准溶液 (50 μg/mL) 色谱图如图 1、2 所示，重复分析 10 次混合标准溶液时的 ATP 色谱峰拖尾因子及峰面积变化如图 3、4 所示。金属流路系统中，由于金属吸附，导致色谱峰出现拖尾，拖尾因子大于 4。

此外，相同样品重复分析时，ATP 的峰面积呈增加趋势。而在无金属流路中，发现峰形得到改善，拖尾因子约为 1。此外，与金属流路系统相比，从第 1 次至第 10 次的峰面积几乎没有变化，重现性好。由此可知，使用无金属流路系统会抑制金属吸附，可以改善峰形和提高面积重现性。

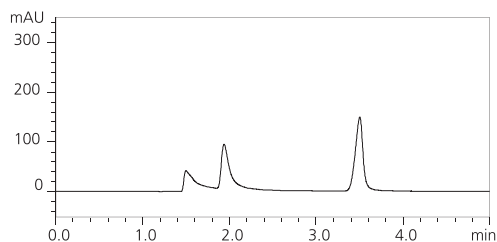


图 1 金属流路中测定的 AMP、ADP、ATP 混合标准样品色谱图 (50 μg/mL)

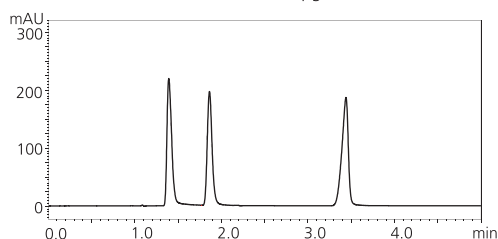


图 2 无金属流路中测定的 AMP、ADP、ATP 混合标准样品色谱图 (50 μg/mL)

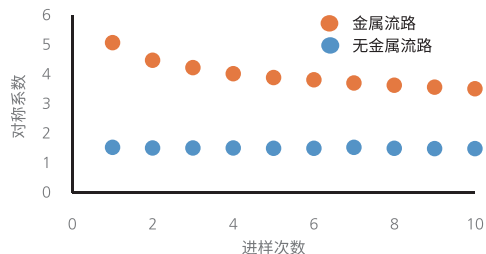


图 3 不同进样次数的 ATP 拖尾因子

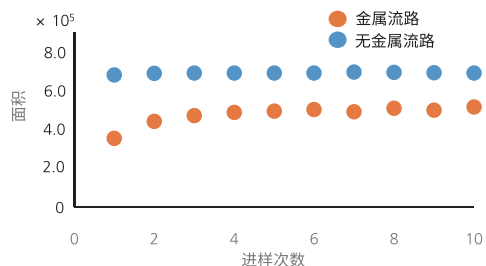


图 4 不同进样次数的 ATP 峰面积值

■ 分析核苷酸标准样品时的定量精度比较

按照表 2 的条件测定 ATP 标准溶液 (1、2.5、5、10、25、50 $\mu\text{g/mL}$)，制作标准曲线。在金属流路系统中测定所得的标准曲线受金属吸附影响，线性降低，相关系数 $r^2 = 0.9918$ (图 5)。各校准点的准确度及精密度如表 3 所示。1 $\mu\text{g/mL}$ 未能检测出。此外，在 2.5 $\mu\text{g/mL}$ 时得以检测出，但由于峰强度不足，浓度值的偏差较大。

制备了 2、20、45 $\mu\text{g/mL}$ 的样品作为 QC 样品，使用图 5 的标准曲线进行定量。定量结果、定量准确度及精密度如表 4 所示。金属流路中，由于受金属吸附的影响，特别是使用线性较差的低浓度区域标准曲线时，定量值偏差较大。

而在非金属流路系统中所得的标准曲线，由于金属吸附抑制效果良好，获得了良好的线性 (相关系数 $r^2 = 0.9999$) (图 6)。

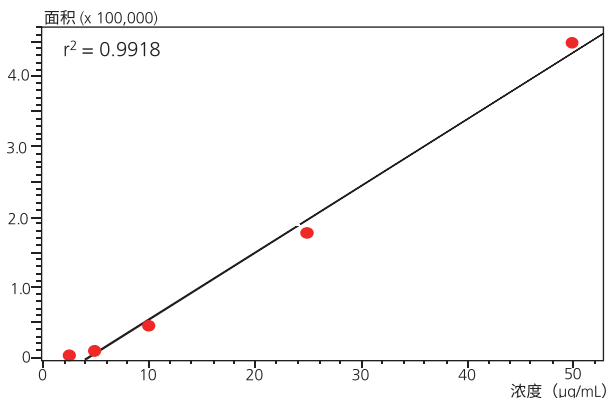


图 5 ATP 的标准曲线 (金属流路)

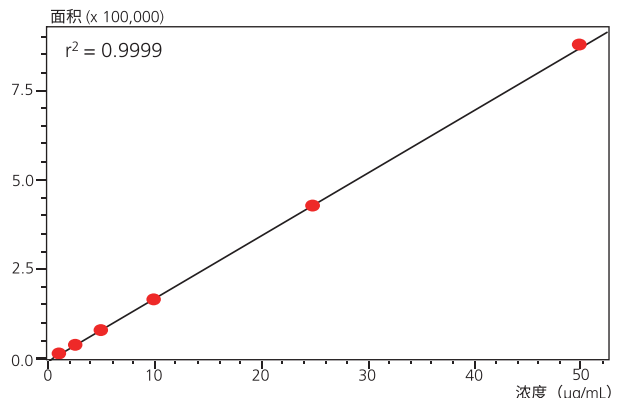


图 6 ATP 的标准曲线 (无金属流路)

表 3 校准点的定量值、准确度及精密度 (金属流路)

浓度($\mu\text{g/mL}$)	定量结果(n = 6)		
	定量值($\mu\text{g/mL}$)	准确度 (%)	精密度 (%)
1	N.D.*	---	---
2.5	2.28	91.0	110
5	5.29	106	4.9
10	8.65	86.5	7.1
25	22.7	91.0	6.3
50	51.3	103	3.6

* N.D.: Not Detected

表 5 校准点的定量值、准确度及精密度 (无金属流路)

浓度($\mu\text{g/mL}$)	定量结果(n = 6)		
	定量值($\mu\text{g/mL}$)	准确度 (%)	精密度 (%)
1	1.07	101	0.61
2.5	2.43	97.0	0.50
5	4.82	96.4	0.28
10	9.74	97.4	0.24
25	24.9	99.4	0.81
50	50.6	101	0.095

表 4 QC 样品的定量值、准确度及精密度 (金属流路)

浓度($\mu\text{g/mL}$)	定量结果(n = 6)		
	定量值($\mu\text{g/mL}$)	准确度 (%)	精密度 (%)
2	4.53	226	1.6
20	18.4	91.9	5.7
45	46.4	103	3.3

表 6 QC 样品的定量值、准确度及精密度 (无金属流路)

浓度($\mu\text{g/mL}$)	定量结果(n = 6)		
	定量值($\mu\text{g/mL}$)	准确度 (%)	精密度 (%)
2	2.00	100	0.59
20	19.6	98.2	0.081
45	44.9	99.7	0.11

岛津应用云



Nexera、Shim-pack 是岛津制作所株式会社在日本及其他国家的商标。



岛津企业管理 (中国) 有限公司
岛津 (香港) 有限公司

<http://www.shimadzu.com.cn>

用户服务热线电话: 800-810-0439
400-650-0439

免责声明:

* 本资料未经许可不得擅自修改、转载、销售;
* 本资料中的所有信息仅供参考, 不予任何保证。
如有变动, 恕不另行通知。

第一版发行日: 2022 年 2 月