Waters™

应用纪要

直面挑战：Arc Premier系统提高难检化合物的灵敏度和重现性

Zhimin Li, Dhvani Shah, Anthony Dovell, Will Martin, Chris Grzonka, Jason Dyke

Waters Corporation

摘要

在本应用纪要中，我们采用三种应用来考察Waters Arc Premier系统与MaxPeak Premier色谱柱配合使用时所获得的性能优势。第一种应用使用腺苷核苷酸作为探针来研究惰性MaxPeak高性能表面(HPS)技术对关键性能参数（例如检测灵敏度和重现性）的影响。研究表明，利用Arc Premier系统可轻松检出起始浓度为0.5 µg/mL的腺苷磷酸化衍生物，峰面积显著，峰拖尾大幅减少。在其他两套液相色谱系统（标准不锈钢系统和标准生物兼容性金属合金系统）上未检测到峰。第二种应用是磷酸类固醇药物分析，展示了Arc Premier系统对金属敏感化合物的峰形、灵敏度、重现性和定量准确度的改善。最后是第三种应用，对非金属敏感化合物的混合物进行反相分析，表明分析方法可以在标准不锈钢系统、标准生物兼容性金属合金系统与Arc Premier系统之间成功转移，且不受非金属敏感化合物分析采用不锈钢色谱柱还是MaxPeak Premier色谱柱的影响。

优势

- MaxPeak高性能表面(HPS)技术大幅减少了检测和定量金属敏感分析物的不确定性
- 改善峰形、灵敏度、重现性和定量准确度
- 非金属敏感分析物能够在Arc Premier系统与标准不锈钢和生物兼容性金属合金系统之间实现无缝方法转移

简介

过去，携带富电子基团的分析物给采用金属材质的液相色谱系统和色谱柱（例如不锈钢(SS)或生物兼容性钛和镍钴合金(MP35N)）带来了挑战。这些富电子基团，包括磷酸基团、不带电荷的胺和去质子化羧酸基团，容易与整个液相色谱系统和色谱柱的金属表面螯合[1]。因此，使用这些液相色谱系统和标准不锈钢色谱柱分析金属敏感化合物获得的峰形较差、灵敏度下降且重现性和稳定性不佳。这些金属-分析物相互作用对开发成功的分析方法有不利影响。采用螯合剂、PEEK管路和系统钝化等解决方法要么不能永久有效，要么与某些溶剂不兼容，要么会降低质谱检测的电离效率[2]。

为应对金属敏感化合物的分析挑战，沃特世开发出ACQUITY Premier系统、Arc Premier系统和MaxPeak Premier色谱柱。ACQUITY Premier系统为使用亚2 µm色谱柱填料进行研究和方法开发的科学家提供了性能优势，而Arc Premier系统则旨在支持使用≥2.5 µm色谱柱填料进行的常规液相色谱分析和方法开发。ACQUITY和Arc Premier系统以及MaxPeak Premier色谱柱均采用MaxPeak HPS技术，而HPS由类似于亚乙基桥杂化硅胶颗粒的高度交联层组成[3]。 MaxPeak HPS技术可提供一层有效的屏障，尽量减少分析物与金属表面的不良相互作用。

本研究采用腺苷及其磷酸化衍生物作为探针，以展示色谱表面如何能够显著影响金属敏感分析物的检测。然后，以磷酸类固醇药物分析为例，重点强调Arc Premier解决方案的优势。最后，在标准系统、标准Bio系统和Arc Premier系统上使用非金属敏感化合物的混合物证明了色谱性能等效性。

实验

液相色谱系统

液相色谱系统	ACQUITY Arc	ACQUITY Arc Bio	Arc Premier
浸湿的流路表面材料	不锈钢	MP35N/钛	MaxPeak HPS
UV检测器	PDA2998	TUV2489	PDA2998
泵类型	QSM（四元溶剂管理器）		
柱温箱	CHA（带主动预加热功能的柱温箱）		

数据管理

色谱软件： Empower 3 FR5

ATP/ADP/AMP/腺苷分析

样品描述

三磷酸腺苷二钠(ATP)和二磷酸腺苷钠(ADP)购自Sigma，一磷酸腺苷(AMP)和腺苷购自Acros。所有样品均溶于由95%流动相A和5%流动相B组成的样品稀释剂中，浓度范围为0.5 µg/mL至200 µg/mL。

方法条件

液相色谱系统	ACQUITY Arc和ACQUITY Arc Bio	Arc Premier
色谱柱：	Xselect HSS T3 XP, 100 Å, 2.5 µm, 4.6 mm × 50 mm（部件号：186006157）	Xselect Premier HSS T3, 100 Å, 2.5 µm, 4.6 × 50 mm（部件号：186009858）
柱温：	35 °C	
样品温度：	10 °C	
进样体积：	15 µL	
流速：	1.5 mL/min	
流动相A：	10 mM醋酸铵，pH 6.8，溶于99.8/0.2水/乙腈中	
流动相B：	8 mM醋酸铵，pH 6.8，溶于79.8/20.2水/乙腈中	
UV波长：	260 nm	

梯度表

时间 (min)	%A	%B
0	99	1
0.2	99	1
7.2	5	95
8.5	5	95
8.6	99	1
10.0	99	1

HCP/BMP/DMP及相关化合物分析

样品描述

磷酸氢化可的松(HCP)三乙胺、倍他米松磷酸钠(BMP)、地塞米松磷酸钠(DMP)、地塞米松和醋酸地塞米松购自Sigma Aldrich。所有样品均溶于由90%水和10%乙腈组成的样品稀释剂中，浓度范围为1 µg/mL至200 µg/mL

方法条件

液相色谱系统	ACQUITY Arc和ACQUITY Arc Bio	Arc Premier
色谱柱：	XBridge BEH C_{18} XP, 130 Å, 2.5 µm, 4.6 mm × 50 mm（部件号：186006037）	Xselect Premier BEH C_{18}, 130 Å, 2.5 µm, 4.6 × 50 mm（部件号：186009847）
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，pH 3.0	
流动相B：	乙腈	
UV波长：	260 nm	

梯度表

时间 (min)	%A	%B
0	82	18
3.0	82	18
7.0	50	50
8.0	50	50
8.1	82	18
10.0	82	18

非金属敏感化合物分析

样品描述

盐酸阿米替林购自Sigma Aldrich，亮氨酸脑啡肽购自沃特世（部件号：186006013 < https://www.waters.com/nextgen/us/en/shop/standards--reagents/186006013-leucine-enkephalin.html > ）。两者均溶于50:50水:乙腈中，然后与Waters ACQUITY UPLC MS启动溶液2（部件号：700002741 < https://www.waters.com/nextgen/us/en/shop/standards--reagents/700002741-acquity---quattro-micro-or-quattro-premier-ms-start-up-solution-.html> ）混合。

方法条件

液相色谱系统	ACQUITY Arc和ACQUITY Arc Bio	Arc Premier
色谱柱：	XBridge BEH C_{18} XP, 130 Å, 2.5 µm, 4.6 mm × 50 mm（部件号：186006037）	Xselect Premier BEH C_{18}, 130 Å, 2.5 µm, 4.6 × 50 mm（部件号：186009847）
柱温：	40 °C	
样品温度：	10 °C	
进样体积：	15 µL	
流速：	1.8 mL/min	
流动相A：	0.01%甲酸的水溶液	
流动相B：	0.01%甲酸的乙腈溶液	
UV波长：	205 nm	

梯度表

时间 (min)	%A	%B
0	95	5
1.0	95	5
7.0	30	70
7.1	10	90
8.0	10	90
8.1	95	5
10.0	95	5

结果与讨论

ATP/ADP/AMP/腺苷分析：评估惰性表面

化合物中的磷酸基团由于具有富电子性，因此可能与暴露的金属位点相互作用，从而吸附到液相色谱系统上。在不存在任何离子对试剂的情况下，这些化合物是评估暴露金属表面的理想探针。为此，使用反相液相色谱方法分析腺苷核苷酸及其磷酸化衍生物（ATP、ADP和AMP）。由于磷酸化腺苷衍生物中磷酸基团的数量决定了化合物的结合程度，因此选择ATP和ADP区域来展示液相色谱系统和色谱柱上的金属表面如何影响金属敏感化合物的检测（图1）。在配备不锈钢(SS)色谱柱的标准SS系统和标准Bio MP35N系统上，均未检出低浓度的ATP和ADP；当浓度增加至25 µg/mL时，虽然检出这两种化合物，但存在严重拖尾（USP拖尾因子>2.0）。将相同的样品进样至与MaxPeak Premier色谱柱配合使用的Arc Premier系统时，轻松检出起始浓度低至0.5 µg/mL的ATP和ADP，获得显著的峰面积和高斯峰形（USP拖尾因子<1.5）。这表明该系统与标准SS和标准Bio MP35N系统相比，对低浓度金属敏感化合物的检测灵敏度显著提高。

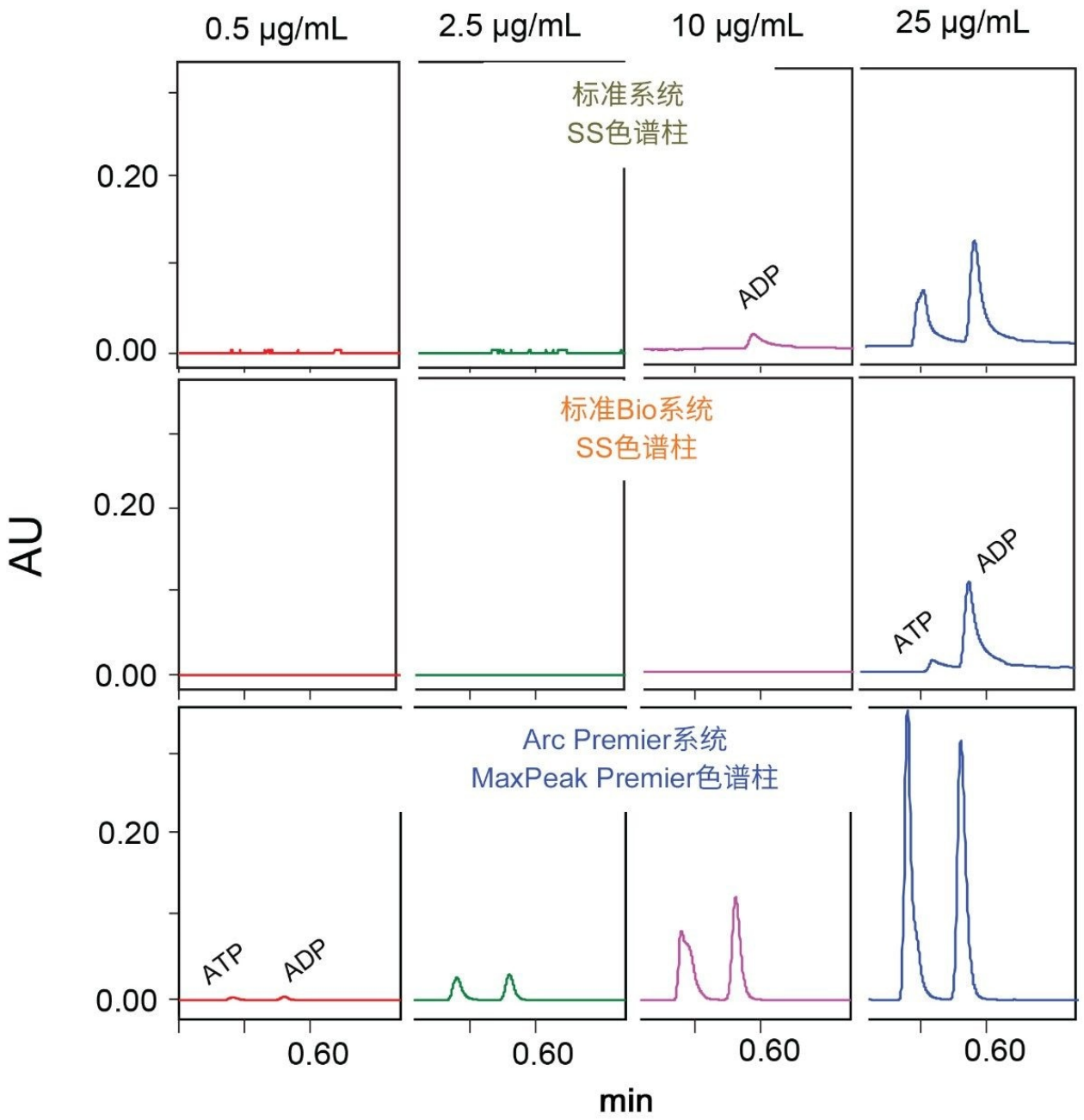

图1.在与*SS*色谱柱配合使用的标准*SS*系统和标准生物兼容性液相色谱系统上以及与*MaxPeak Premier*色谱柱配合使用的*Arc Premier*系统上，浓度从0.5 µ*g/mL*增加至25 µ*g/mL*的*ATP*和*ADP*的检测结果比较

采用标准SS和标准MP35N Bio液相色谱系统时，金属敏感化合物常表现出进样重现性不佳的情况。差异性程度取

决于具体化合物、系统使用历史和暴露程度、流动相等[4]。 图2展示了这三种液相色谱系统上第1次进样与第100次进样ATP混合物所得到的结果比较。经过重复进样后，在配备SS色谱柱的标准SS和标准Bio系统上，ATP从无法检出变为能够检出；ADP在标准Bio系统上的结果也是如此。此外，在标准SS和标准Bio系统上，AMP峰面积随进样次数增加而增加。在配备MaxPeak Premier色谱柱的Arc Premier系统上，第1次进样与第100次进样相比，未观察到明显的峰面积差异。在Arc Premier系统上观察到峰面积重现性和峰形改善，原因是采用创新的MaxPeak HPS技术有效抑制了金属-分析物相互作用。

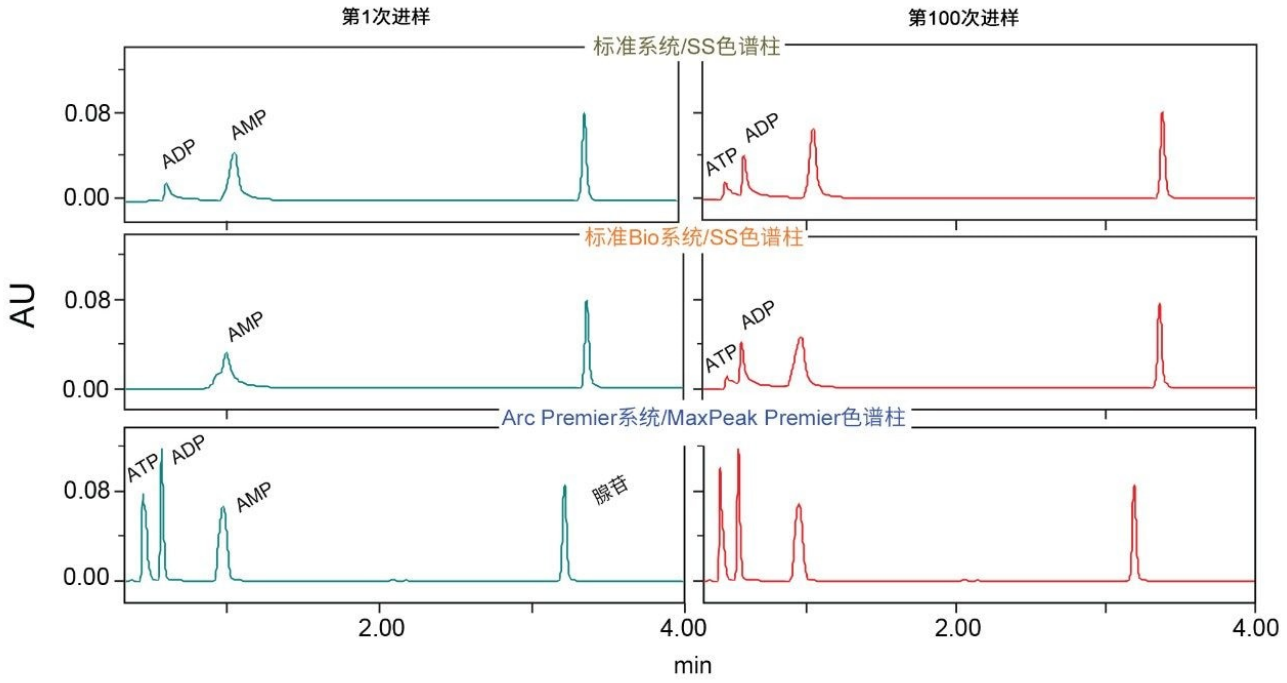

图2.标准*SS*系统、标准*Bio*系统和*Arc Premier*系统上第1次进样与第100次进样结果的比较，其中*ATP*、ADP和*AMP*的浓度为10 µ*g/mL*，腺苷浓度为5 µ*g/mL*。

分析复杂的样品基质时，采用反相分离可能不够稳定，因为该方法无法保留所有核苷酸，比如观察到ATP在死体积附近洗脱。不过，ATP混合物在研究惰性色谱表面的有效性方面可用作一种实用探针。

HCP/BMP/DMP及相关化合物分析：提高灵敏度、重现性和定量准确度

HCP和DMP、皮质类固醇可缓解炎症，对内分泌失调和某些形式的免疫和过敏性疾病也有治疗作用[5]。 与ATP类似，HCP和DMP中的富电子磷酸基团容易吸附到金属表面。图3比较了浓度为1 µg/mL和25 µg/mL的HCP/DMP及相

关化合物在标准SS系统、标准Bio系统和Arc Premier系统上的分析结果。在配备SS色谱柱的标准SS系统和标准Bio系统中，三种化合物（包括HCP、BMP和DMP）受到金属表面的严重影响。在低至1 µg/mL的浓度下，这三种化合物在标准系统上几乎无法检出；在标准Bio系统上还表现出较低的峰强度和严重拖尾，导致难以对色谱峰进行一致的积分。相反，在配备MaxPeak Premier色谱柱的Arc Premier系统上，观察到这三种化合物均获得尖锐且对称的峰。当浓度增加至25 µg/mL时，HCP、BMP和DMP在标准SS和标准Bio系统上得到的峰强度有所提高，但是，与采用Arc Premier系统得到的结果相比，这些峰明显更宽，且拖尾更严重。

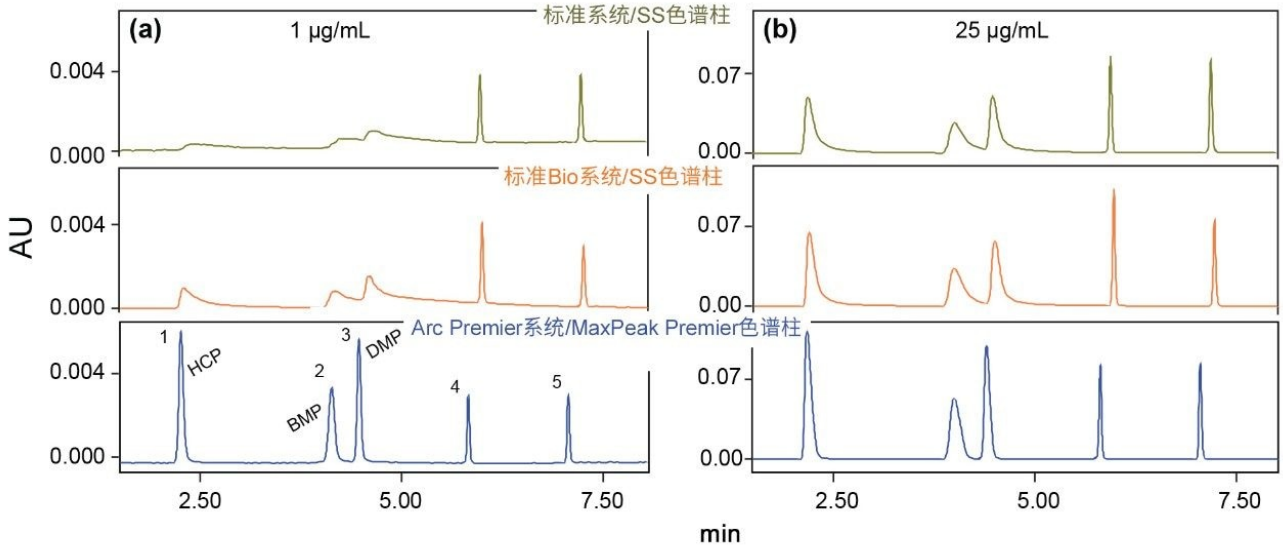

图3. *HCP/DMP*及相关化合物在标准系统（*SS*色谱柱）、标准*Bio*系统（*SS*色谱柱）和*Arc Premier*系统（*MaxPeak Premier*色谱柱）上的分析结果比较，分析浓度如下：(*a*)化合物1、2和3为1 µ*g/mL*，化合物4和5为0.3 µ*g/mL*；(b)化合物1、2和3为25 µ*g/mL*，化合物4和5为7.5 µ*g/mL*。（峰标签：1 - *HCP*、2 - BMP、3 - DMP、4 - 地塞米松、5 - 醋酸地塞米松）。

宽峰和拖尾峰会影响数据重现性和定量准确度。我们以HCP作为代表性化合物，比较了在标准系统、标准Bio系统和Arc Premier系统上分析六组精密度评估样品得到的峰面积%RSD（图4）。在六组精密度评估样品中，采用Arc Premier系统得到的峰面积%RSD最低，处于0.05%~0.3%的范围内；采用标准系统得到的峰面积%RSD最大，处于0.8%~1.4%的范围内；而采用标准Bio系统得到的结果则介于两者之间，处于0.15%~0.4%的范围内。尽管由这三种系统得到的三条HCP校准曲线的R^2表现为相同的数量级（图5），但是观察到采用标准SS和标准Bio系统得到的结果（使用峰面积与浓度的对数标度）在低浓度下均偏离线性（图6a），并且偏离一致的响应因子（峰面积/浓度）（图6b）。直接影响表现为低浓度HCP的定量偏差%。当浓度为5 µg/mL时，重复进样分析结果显示，采用

标准SS和标准Bio系统得到的六组校准曲线之间的差异更大（标准SS系统的最高偏差%为22%；标准Bio系统的最高偏差为15%）（图7）。对于Arc Premier系统，六组HCP校准曲线的平均偏差%为0.4%，最大值为2.6%。采用配备MaxPeak Premier色谱柱的Arc Premier系统时，磷酸类固醇药物分析的数据重现性、灵敏度、线性动态范围和定量准确度均得到极大改善。

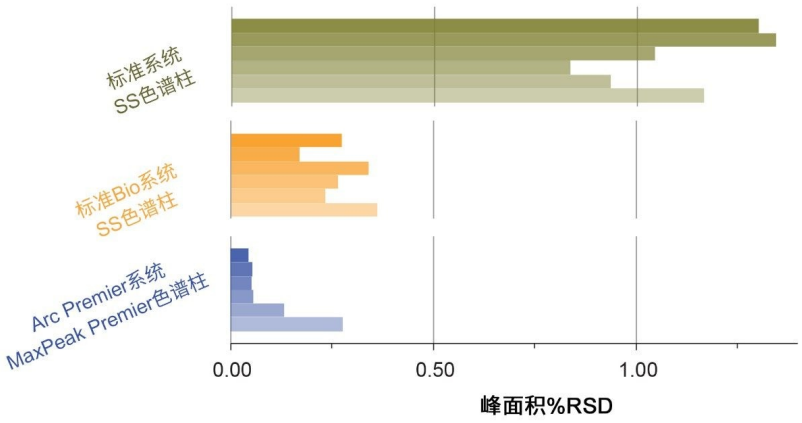

图4.采用标准系统、标准*Bio*系统和*Arc Premier*系统分析浓度为25 µ*g/mL*的六组精密度评估样品中*HCP*峰的峰面积%*RSD*比较（每个数据条代表每组六次重复进样所得到的峰面积%*RSD*）

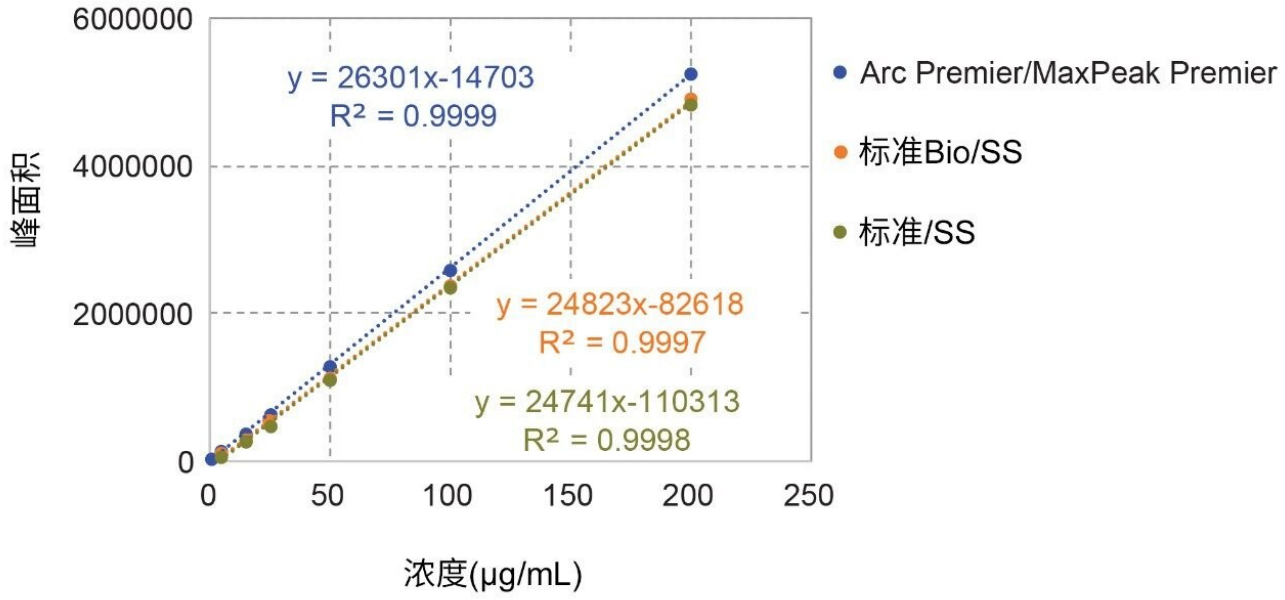

图5.三种液相色谱系统得到的*HCP*的校准曲线。所有校准曲线均采用1/*x*加权确定。对于标准系统（*SS*色谱柱）和标准*Bio*系统（*SS*色谱柱），校准范围为5 μ*g/mL~200 μg/mL*；对于*Arc Premier*系统（*MaxPeak Premier*色谱柱），校准范围为1 μ*g/mL~200 μg/mL*。

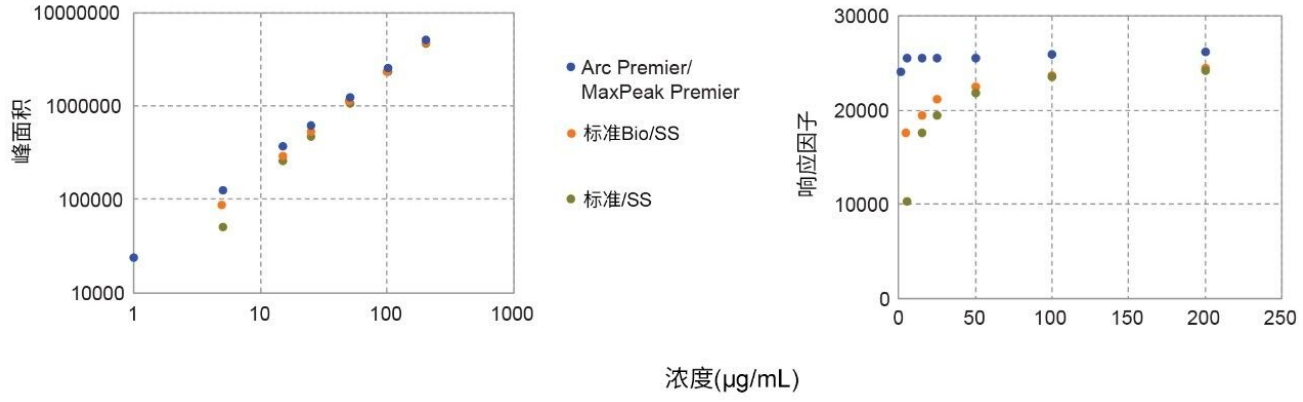

图6.*HCP*标准品的两幅替代图。(*a*)峰面积与浓度的对数图；(*b*)响应因子（峰面积/浓度）与浓度关系图。对于标准*SS*和标准*Bio*系统，校准范围为5 μ*g/mL~200 μg/mL*，对于*Arc Premier*系统，校准范围为1 μ*g/mL~200 μg/mL*。

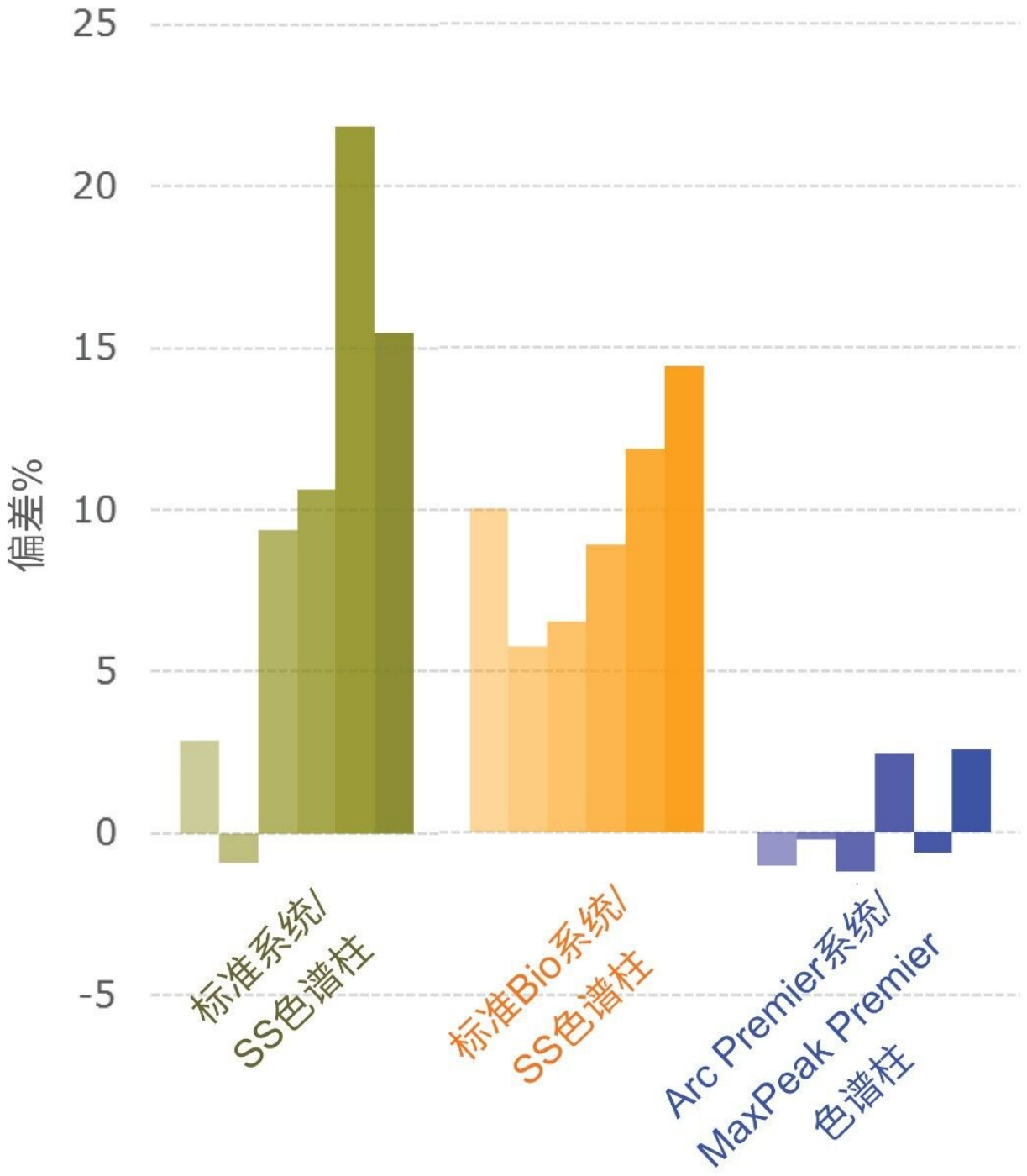

图7.*HCP*的六组校准曲线中5 μ*g/mL*下的定量准确度偏差%比较

非金属敏感化合物分析：方法转移

在上述ATP/ADP/AMP/腺苷和HCP/BMP/DMP及相关化合物分析案例中，Arc Premier系统与MaxPeak Premier色谱柱结合使用的优势体现在提高了金属敏感化合物的灵敏度、重现性、动态线性范围和定量准确度。而这两个案例中的非金属敏感化合物（例如腺苷、地塞米松和醋酸地塞米松）在三种液相色谱系统上得到的峰形、检测灵敏度和数据重现性相当（数据未显示）。这表明用于非金属敏感化合物的液相色谱方法可以在标准SS系统、标准Bio系统与Arc Premier系统之间转移，与其使用的色谱柱类型（不锈钢色谱柱或MaxPeak Premier色谱柱）无关。

我们以具有不同理化特性的七种非金属敏感化合物的混合物为例，展示标准SS系统、标准Bio系统与Arc Premier系统之间的液相色谱方法可转移性。标准SS和标准Bio系统均使用由SS硬件制成的色谱柱，而Arc Premier系统则使用由MaxPeak HPS硬件制成的MaxPeak Premier色谱柱。在这三种系统中观察到相当的色谱图，获得了相似的保留时间和峰形（图8）。表1展示了这七种化合物（各化合物的浓度均为10 µg/mL）六次重复进样得到的保留时间标准偏差(RT SD)和峰面积%RSD比较。采用标准SS系统、标准Bio系统和Arc Premier系统分析这七种化合物得到的保留时间标准偏差均为0.05~0.22 s，峰面积%RSD为0.04%~1%。由于色谱性能相当，由此证明非金属敏感化合物分析方法在这三种液相色谱系统之间具有可转移性。

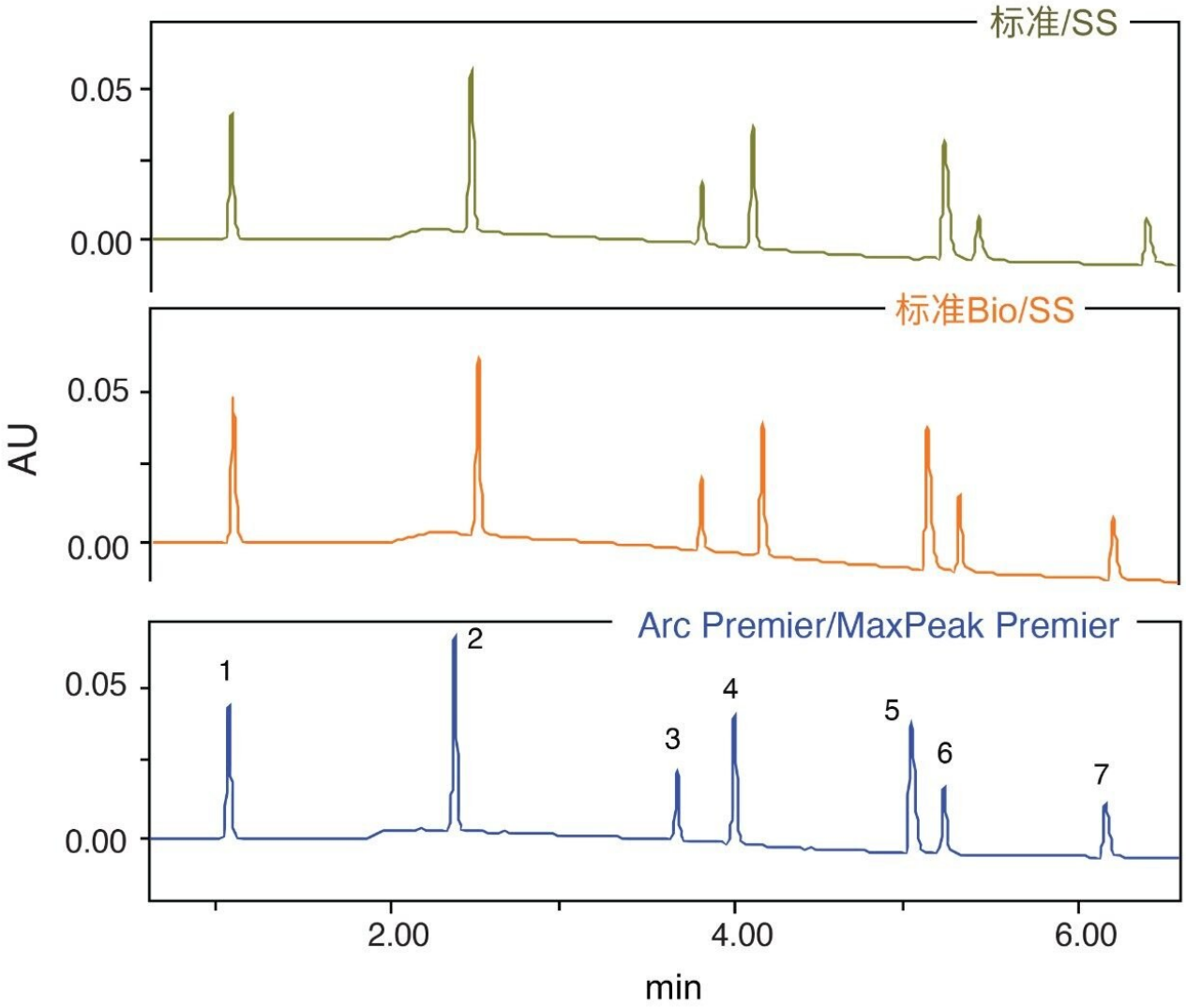

图8.非金属敏感化合物在三种系统上的反相分离结果比较（峰标签：1 - 对乙酰氨基酚、2 - 咖啡因、3 - 亮氨酸脑啡肽、4 - 磺胺二甲氧嘧啶、5 - 阿米替林、6 - 利血平、7 - 特非那定）。各化合物浓度均为10 μ*g/mL*。

峰	属性	标准SS	标准Bio/SS	Arc Premier/ MaxPeak Premier
对乙酰氨基酚	RT SD (s)	0.05	0.05	0.05
	峰面积%RSD	0.07	0.05	0.10
咖啡因	RT SD (s)	0.06	0.07	0.06
	峰面积%RSD	0.06	0.04	0.08
亮氨酸脑啡肽	RT SD (s)	0.09	0.09	0.09
	峰面积%RSD	0.10	0.07	0.09
磺胺二甲氧嘧啶	RT SD (s)	0.10	0.05	0.06
	峰面积%RSD	0.04	0.05	0.07
阿米替林	RT SD (s)	0.16	0.07	0.12
	峰面积%RSD	0.14	0.18	0.10
利血平	RT SD (s)	0.15	0.08	0.12
	峰面积%RSD	0.13	0.29	0.18
特非那定	RT SD (s)	0.22	0.06	0.17
	峰面积%RSD	0.21	0.91	0.14

表1.采用标准*SS*系统（*SS*色谱柱）、标准*Bio*系统（*SS*色谱柱）和*Arc Premier*系统（*MaxPeak Premier*色谱柱）分析非金属敏感化合物（各化合物浓度均为10 μ*g/mL*）得到的保留时间标准偏差(*RT SD)*和峰面积%*RSD*的重现性(*n=6)*比较

结论

Arc Premier系统与MaxPeak Premier色谱柱采用沃特世的创新MaxPeak高性能表面技术，为过去具有挑战性的分析物提供了解决方案，这些分析物倾向于吸附到传统不锈钢液相色谱系统和生物兼容性金属合金液相色谱系统中的金属表面上。使用ATP/ADP/AMP/腺苷混合物作为探针，证明Arc Premier系统与其他两种使用金属材料的液相色谱系统相比，显著改善了检测灵敏度和峰形。在磷酸类固醇化合物分析中，采用配备MaxPeak Premier色谱柱的Arc Premier系统改善了数据精密度、灵敏度和定量偏差%。最后，在非金属敏感化合物分析中，配备MaxPeak Premier色谱柱的Arc Premier系统与传统SS和生物兼容性金属合金液相色谱系统的色谱性能相当。

参考资料

1. Tanna, N.; Plumb, R.; Mullin, L. 使用ACQUITY Premier系统和ACQUITY Premier色谱柱改善磷酸类固醇药物定量分析的灵敏度.沃特世应用纪要, 720007095ZH < https://www.waters.com/nextgen/global/library/application-notes/2020/improvements-in-sensitivity-for-quantification-of-steroid-phosphate-drugs-using-acquity-premier-lc-and-maxpeak-hps-columns.html> , 2021.

2. 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/global/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.

3. Lauber, M.; Walter, T.H.; Gilar, M.; Delano, M.; Boissel, C.; Smith, K.; Birdsall, R.; Rainville, P.; Belanger, J.; Wyndham, K. Low Adsorption HPLC Columns Based on MaxPeak High Performance Surfaces.Waters White Paper, 720006930EN < https://www.waters.com/waters/library.htm?cid=511436&lid=135074404&lcid=135074403> , 2020.

4. Patel, A.; Simeone J.; Rzewuski, S.; Jung, M.; Lauber, M. 使用Premier标准品研究色谱表面的惰性.沃特世应用纪要, 720007105ZH <https://www.waters.com/nextgen/global/library/application-notes/2021/premier-standards-to-investigate-the-inertness-of-chromatographic-surfaces.html> , 2021.

5. Cevc, G.; Blume, G. Hydrocortisone and Dexamethasone in ery Deformable Drug Carries Have Increased the Biological Potency, Prolonged Effect, and Reduced Therapeutic Dosage.*Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Biomembranes.*2004, 663 (1-2), 61-73.

特色产品

ACQUITY Arc系统 <https://www.waters.com/134844390>

ACQUITY Arc Bio系统 <https://www.waters.com/134966135>

Arc Premier系统 <https://www.waters.com/waters/nav.htm?cid=135083359>

2998光电二极管阵列(PDA)检测器 <https://www.waters.com/1001362>

2489紫外可见光(UV/Vis)检测器 <https://www.waters.com/515198>

Empower色谱数据系统 <https://www.waters.com/10190669>

720007267ZH，2021年6月

© 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