

## 方法开发报告 2013-APP-RLC-016

## UHPLC-MS 同时检测奶粉和母乳中十种核苷和核苷酸

## 赛默飞世尔科技色谱产品应用中心

检测项目	十种核糖核苷、单磷酸核苷酸
仪器型号	Thermo Ultimate 3000 系统串联 TSQ Vantage MS: 泵: DGP-3600RS 自动进样器: WPS-3000RS 柱温箱: TCC-3000RS 检测器: DAD-3000RS and TSQ Vantage 色谱软件: Chromeleon 6.8 and Xcalibur
方法开发	曾明飞, 张婷婷
审核人	金燕
时间	2013.03.20-2013.04.01

## 1. 引言

核苷酸 (Nucleotide) 是核苷 (Nucleoside) 和磷酸 (Phosphate groups) 结合的化学物质, 其中核苷一磷酸是有代表性的一系列品种。多个核苷酸连接成锁状物质由其含有核苷酸的数量分为寡核苷酸 (15 个或少于 15 个核苷酸) 和多核苷酸 (15 个核苷酸以上), 后者也是构成 DNA (去氧核糖核酸) 和 RNA (核糖核酸) 的单位, 生物的细胞中都存在。因其具有相当的重要性, 对于核苷酸和核苷的研究已经成为目前生物医药, 食品添加剂, 母婴用品等方面的研究重点。

在一些临床研究发现, 添加核苷酸的婴儿配方奶粉, 可以减少腹泻的发生及促进较小胎儿的生长发育。而牛奶中一般不含有核苷酸, 且目前的婴幼儿配方奶粉国家标准中未规定这项指标, 但是根据核苷酸对婴幼儿的特殊功效, 大部分的乳品企业都将其作为重要指标, 因此建立简单方便的检测乳制品中核苷酸的方法就显得迫在眉睫。

查阅文献发现, 目前对于核苷酸和核苷的测定方法主要是基于 HPLC-UV 或 LC-MS 为主, 尤其是随着 MS 技术的普及, 采用 LC-MS 方法检测核苷酸和核苷已经逐渐成为主流<sup>[1-10]</sup>。然而因为核苷酸与核苷本身的物理化学性质导致其在采用 LC-MS 检测是不可避免会产生局限性。因其强极性性质, 导致其在常规的反相色谱柱上面往往不易保留, 对此问题 Coulier<sup>[1]</sup>等, Viñas<sup>[7]</sup>等和 Yamaoka<sup>[8]</sup>等采取添加离子对试剂或者 Inoue 等<sup>[3]</sup>采用 HILIC 的并且选择高浓度的 (30 mM 甲酸铵) 缓冲盐。因此文献中报道的方法普遍存在的检测限过高问题, 例如 Ren<sup>[6]</sup>等采用 LC-MS 同时检测 5 种核苷酸检测限都在 0.01 µg/ml 以上, Inoue<sup>[3]</sup>等采用 HILIC-MS 同时检测 5 中核苷酸检测限为 0.005 µg/ml 以上。

本方法结合已有的 HPLC 方法，通过方法优化，使得能够同时十分灵敏（0.02-1.0 ng/ml）时测定奶粉中十种核苷酸和核苷（包括 AMP、IMP、UMP、CMP、GMP、A、I、U、C、G）的方法，并且峰型良好，方法简单方便，与已发表文献相比具有相当的优越性易推广到应用到实际样品的测定中。

## 2. 对照品和样品前处理

### 2.1 标准溶液配制

分别精密称量尿嘧啶核苷（U）、鸟嘌呤核苷（G）、腺嘌呤核苷（A）、肌苷（I）、胞嘧啶核苷（C）、单磷酸腺苷（AMP）、单磷酸鸟嘌呤核苷（GMP）、单磷酸次黄嘌呤核苷（IMP）、单磷酸尿嘧啶核苷（UMP）、单磷酸胞嘧啶核苷（CMP）固体粉末标准品 5.0 mg 分别溶解于 1 ml 去离子水中，混匀，分别得到 5.0 mg/ml 的十种标准溶液；结构如 Fig 1.

取十种标准溶液不同体积，用去离子水稀释混匀得到一系列浓度的标准溶液（0.02、0.05、0.2、0.5、1、2、5、10、20、100、200、500 ng/ml）。

### 2.2 样品前处理：

**奶粉样品：**准确称取 5.0 g 左右的样品，用 25 ml 温水溶解后放入超声波水浴中超声震荡 10 min 取出，量取 20 ml 转入 50ml 容量瓶中，加入 1 ml 25%的乙酸沉淀蛋白，再用超纯水定容到 50ml 后混匀，离心取上清液，稀释 10 倍，过 0.22  $\mu$ m 滤膜，直接进样分析；

**母乳：**准确量取 2 ml 液体样品，用 3 ml 温水稀释混匀后放入超声波水浴中超声震荡 10 min 取出，加入 0.4 ml 25%的乙酸沉淀蛋白，再加入 4.6ml 的去离子水到 10 ml 混匀，离心取上清液，稀释 10 倍，过 0.22  $\mu$ m 滤膜，直接进样分析；

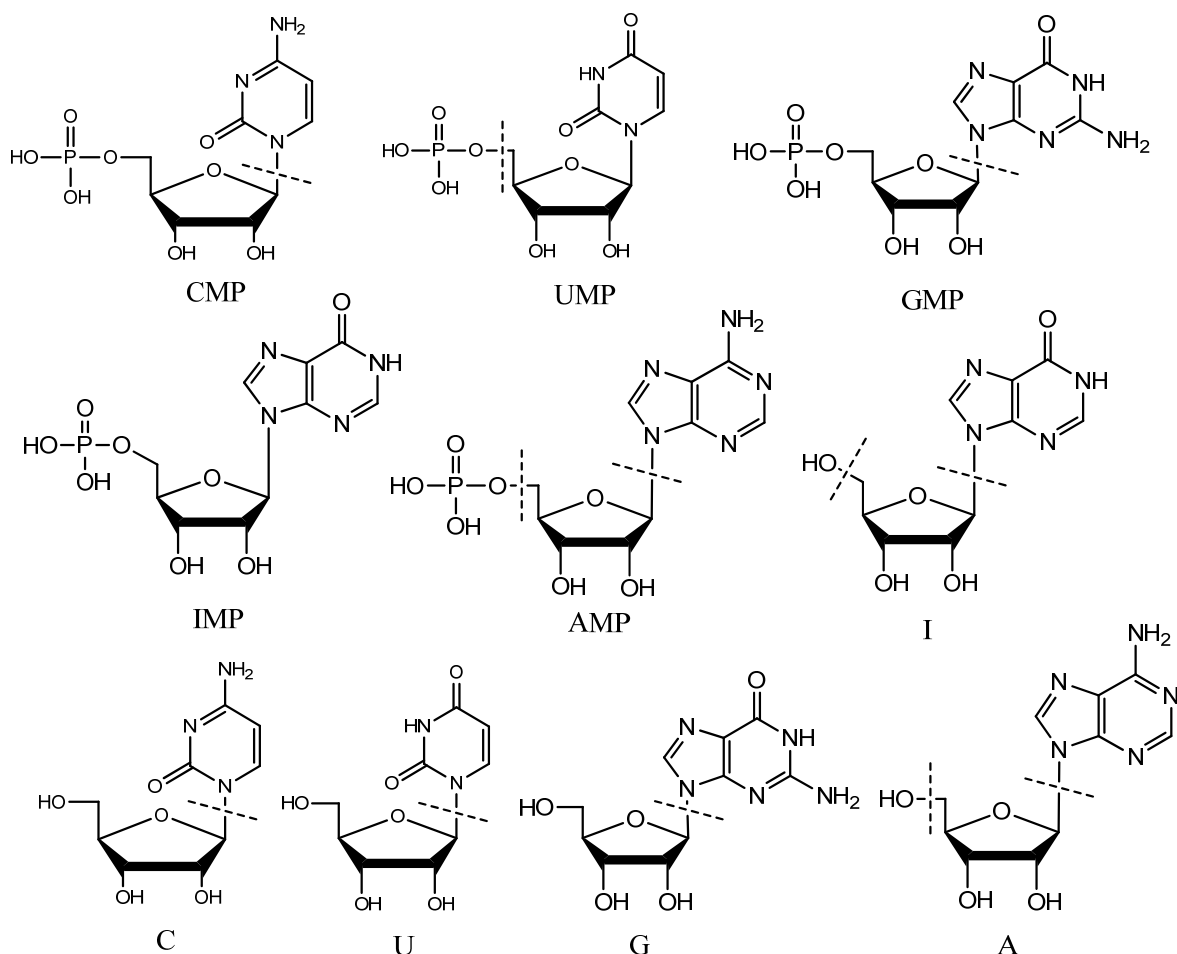


Fig 1. Chemical structures and fragmentations of nucleotides

### 3. 色谱，质谱分析条件及方法学考察

#### 3.1 色谱，质谱分析条件

Tab 1. LC condition for the analysis of nucleotides

色谱柱	Acclaim C30, 2.1 mm×150 mm, 3 μm (S/N001008, P/N075725)																																
流动相	A: 5 mM ammonium formate in H <sub>2</sub> O; B: 0.1% Formic acid in Methanol; 梯度条件:																																
	<table border="1"> <thead> <tr> <th>Time/min</th> <th>Flow Rate (ml/min)</th> <th>A</th> <th>B</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>-2.0</td> <td>0.4</td> <td>99</td> <td>1</td> </tr> <tr> <td>0</td> <td>0.4</td> <td>99</td> <td>1</td> </tr> <tr> <td>2.5</td> <td>0.4</td> <td>99</td> <td>1</td> </tr> <tr> <td>5.9</td> <td>0.4</td> <td>90</td> <td>10</td> </tr> <tr> <td>9.0</td> <td>0.4</td> <td>62</td> <td>38</td> </tr> <tr> <td>11.9</td> <td>0.4</td> <td>62</td> <td>38</td> </tr> <tr> <td>12.0</td> <td>0.4</td> <td>99</td> <td>1</td> </tr> </tbody> </table>	Time/min	Flow Rate (ml/min)	A	B	-2.0	0.4	99	1	0	0.4	99	1	2.5	0.4	99	1	5.9	0.4	90	10	9.0	0.4	62	38	11.9	0.4	62	38	12.0	0.4	99	1
	Time/min	Flow Rate (ml/min)	A	B																													
	-2.0	0.4	99	1																													
	0	0.4	99	1																													
	2.5	0.4	99	1																													
	5.9	0.4	90	10																													
	9.0	0.4	62	38																													
11.9	0.4	62	38																														
12.0	0.4	99	1																														

	15.0	0.4	99	1
--	------	-----	----	---

Tab 2. The SRM conditions of nucleotides s in HESI mode in LC-MS/MS

Analytes	Identity	Precursor ion (m/z)	Product ion (m/z)	Collision energy (eV)	S-Lens	Retention time (min)
CMP	[M+H] <sup>+</sup>	324.184	112.082*	15	72	2.40
			149.018	17		
UMP	[M+H] <sup>+</sup>	325.062	97.059*	15	80	2.81
			284.284	17		
C	[M+H] <sup>+</sup>	244.089	95.075	39	63	4.97
			112.082*	13		
GMP	[M+H] <sup>+</sup>	364.070	135.057	41	91	6.25
			152.053*	19		
IMP	[M+H] <sup>+</sup>	349.070	136.042	21	80	6.63
			137.042*	21		
U	[M+H] <sup>+</sup>	245.078	112.010	15	63	7.21
			113.042*	14		
AMP	[M+H] <sup>+</sup>	348.078	119.095*	52	103	8.62
			136.083	20		
I	[M+H] <sup>+</sup>	269.092	119.071*	36	62	9.38
			137.058	14		
G	[M+H] <sup>+</sup>	284.093	135.036*	38	69	9.57
			152.058	15		
A	[M+H] <sup>+</sup>	268.099	119.065*	41	89	10.05
			136.087	18		

\* 为定量离子对

离子源参数:

离子化方式: ESI, Postive

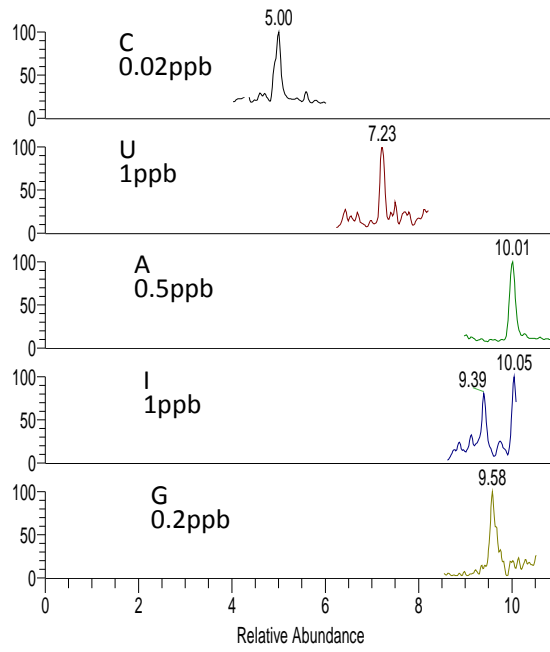
Voltage: 5000 V; Capillary Temperature: 270.0 °C, Vaporizer Temperature: 380.0 °C, Sheath Gas Pressure: 50.0 arb, Ion Sweep Gas Pressure: 0 arb, Auxiliary Gas Pressure: 10.0 arb, Collision Gas Pressure): 1.5 mTorr

质谱扫描参数: 分辨率: Q1及Q3均为0.7 FWHM.

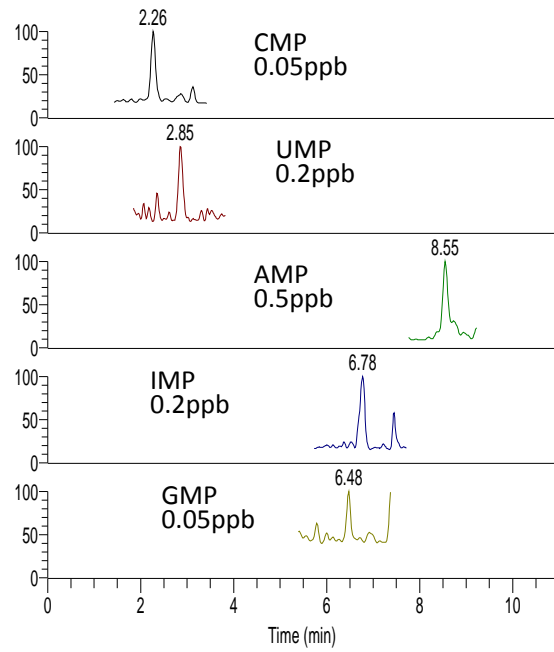
### 3.2 方法学考察

#### 3.2.1 线性、最低定量限

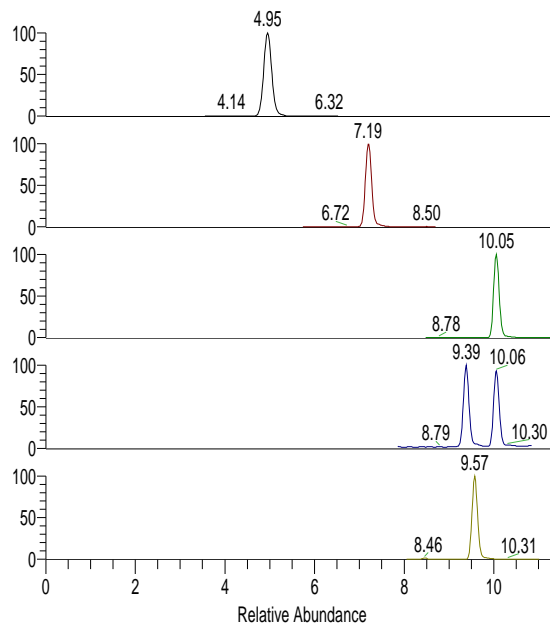
将上述 2.1 中配置的系列混标工作溶液: 0.02、0.05、0.2、0.5、1、2、5、10、20、100、200、500 ng/ml 混标工作溶液, 进样体积 20 μl 注入 LC-MS, 结果显示线性及 LLOQ 结果良好, 如 Fig2 和 Tab 3.



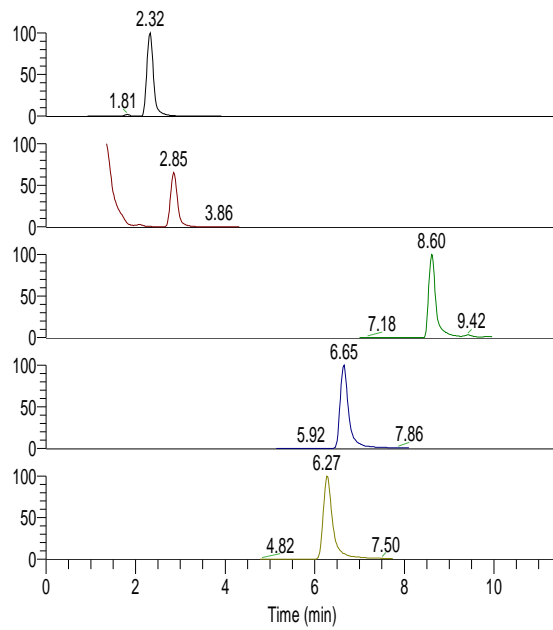
**A.**



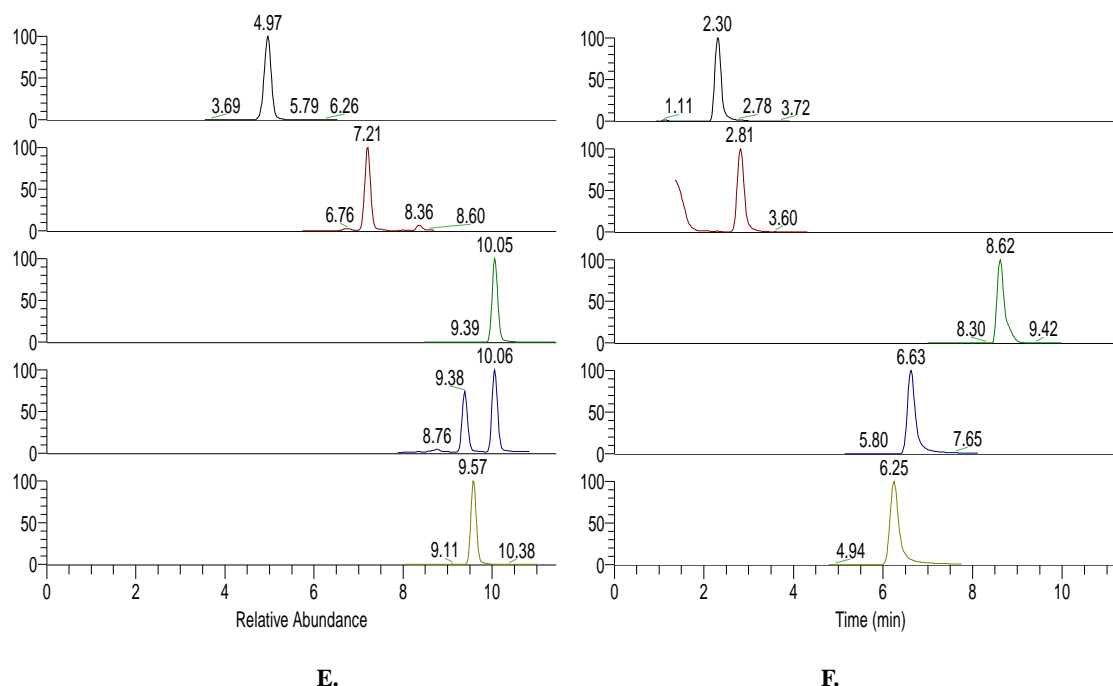
**B.**



**C.**



**D.**



**Fig 2. Representative SRM chromatograms of the nucleotides: LLOQ (A and B), human milk sample (C and D), milk powder (E and F)**

**Tab 3. Regression equation, linear range and LLOQ for LC\_MS/MS analysis of nucleotides**

Analyte	Regression equation	R-squared	Calibration Curve	Linear range (ng/ml)	LOQ* (ng/ml)
CMP	$Y = -197.609 + 1433.11 * X$	0.9939	Linear	0.05-500	0.05
UMP	$Y = -16.7056 + 488.561 * X$	0.9945	Linear	0.2-500	0.2
C	$Y = -150.681 + 2803.95 * X$	0.9956	Linear	0.02-500	0.02
GMP	$Y = -114.235 + 1104.55 * X$	0.9899	Linear	0.05-500	0.05
IMP	$Y = -406.521 + 693.837 * X$	0.9923	Linear	0.2-500	0.2
U	$Y = 10.6928 + 145.133 * X + 0.0147362 * X^2$	0.9979	Quadratic	1.0-500	1.0
AMP	$Y = 3.35496 + 2639.87 * X$	0.9914	Linear	0.5-500	0.5
I	$Y = -318.38 + 1876.87 * X$	0.9984	Linear	1.0-500	1.0
G	$Y = 307.478 + 1428.61 * X$	0.9978	Linear	0.2-500	0.2
A	$Y = 2950.58 + 2958.68 * X - 0.1978 * X^2$	0.9949	Quadratic	0.5-500	0.5

\*Limit of quantitation (S/N>10).

### 3.2.2 精密度实验

分别取低浓度，中浓度，高浓度的混标溶液，连续进样5次。精密度结果如Tab 4. 低浓度的精密度均在9%以内，中、高浓度精密度均在8%以内，结果良好。

**Tab 4. Precision of nucleotides (n=5)**

Nominal Concentration	Precision (%)									
	CMP	UMP	GMP	IMP	AMP	C	U	I	G	A
Low	5.59	4.79	6.17	6.08	6.28	2.21	3.96	8.27	8.40	3.64

<b>Medium</b>	3.07	6.32	5.70	2.62	7.10	1.28	7.12	4.43	3.25	1.25
<b>High</b>	2.60	1.85	2.06	2.41	3.20	2.45	2.67	2.32	2.53	3.61

### 3.2.3. 加样回收率

分别取奶粉5 g，母乳2 ml，分别加入定量的核苷酸混标溶液，按照样品前处理方法制备待测溶液，计算回收率，结果均在80-115%之间，如Tab 5.

**Tab 5.The recovery of nucleotides (n=5)**

分析物	样品 1 (奶粉)				样品 2 (母乳)			
	测量值 (ng/ml)	加标值 (ng/ml)	加标后测定 值(ng/ml)	回收率 (%)	测量值 (ng/ml)	加标值 (ng/ml)	加标后测定 值(ng/ml)	回收率 (%)
<b>CMP</b>	272.0	40	299.0	95.83	307.0	20	339.0	103.7
<b>UMP</b>	198.0	40	209.0	87.82	164.0	20	199.0	108.2
<b>C</b>	36.00	40	68.00	89.47	15.00	20	33.00	94.29
<b>GMP</b>	87.91	40	108.9	85.15	15.04	20	30.95	88.33
<b>IMP</b>	ND*	40	34.03	85.08	2.69	20	18.99	83.69
<b>U</b>	120.0	40	142.0	88.75	43.00	20	63.00	100.0
<b>AMP</b>	124.0	40	155.0	94.51	23.00	20	40.62	94.47
<b>I</b>	6.937	40	52.583	112.3	0.688	20	18.29	88.40
<b>G</b>	10.75	40	47.37	93.34	3.620	20	22.20	93.99
<b>A</b>	8.360	40	50.16	103.7	7.642	20	29.56	106.9

\*ND: no detected.

## 4. 样品分析结果与讨论

### 4.1 样品分析结果

选取母乳及婴儿配方奶粉，根据样品处理方法进行测定，每批平行测定2次，结果如Tab 6.

**Tab 6. Testing result of nucleotides (n=2)**

分析物	测定值	
	奶粉 (µg/g)	母乳 (µg/ml)
<b>CMP</b>	27.2	15.4
<b>UMP</b>	19.8	8.20
<b>AMP</b>	12.4	1.15
<b>GMP</b>	8.79	0.75
<b>IMP</b>	ND	0.14
<b>C</b>	3.60	0.75
<b>U</b>	12.0	2.15
<b>A</b>	0.84	0.38
<b>G</b>	1.08	0.18
<b>I</b>	0.69	0.03

### 4.2 讨论

本方法在开发的过程中主要有如下几方面问题：离子化模式选择、化合物灵敏度、峰型拖尾、

离子通道之间的干扰、极性化合物保留、化合物稳定性等。

对于离子化模式的选择，开始核苷酸选择负离子模式，核苷选择正离子模式，但是因为同时检测正负离子，在流动相添加剂方面的不可避免会造成某一模式的损失。后通过查阅文献，同时分析化合物结果，核苷酸中因为氨基和磷酸基团的存在，既可正负离子形式都可以稳定存在的化合物，考虑到同时检测核苷，并且由于正离子模式的灵敏度高于负离子模式，因此优选正离子模式。通过调谐得到的离子对信息与文献报道一致<sup>[3]</sup>，断裂方式如图1。

对于化合物灵敏度优化，因为核苷酸和核苷均为极性化合物，一般无论是在正离子模式还是负离子模式下，非极性化合物的响应值都明显比极性化合物的响应值高。有研究认为，极性化合物倾向于留在液滴内部与极性溶剂作用，作用过程中失去电荷成为中性分子，而分析物的非极性官能团到达液滴表面，与空气作用降低了与极性溶剂的作用，使其以稳定离子形式存在<sup>[11]</sup>。基于核苷酸与核苷同时选择的正离子模式，灵敏度较同时正负离子模式要高得多。此外，通过优化离子源参数，包括Capillary Temperature, Vaporizer Temperature, Sheath Gas Pressure, Ion Sweep Gas Pressure, Auxiliary Gas Pressure等。文献中选用的方法较多都是高浓度的缓冲液(20 mM乙酸铵，或30 mM甲酸铵等)或者离子对时间，甚至使用磷酸盐缓冲溶液<sup>[3, 7, 12]</sup>，这种条件对于仪器或者是方法优化是很不利的。本方法在方法开发的过程中发现乙酸铵的加入对化合物的响应值会有所降低，因此试图不加入乙酸铵等缓冲盐，但是在没有缓冲盐的情况下，核苷酸对峰型很不理想，尤其是UMP呈坍塌状，因此通过优选缓冲盐种类和浓度，最后发现在该条件缓冲液(5 mM甲酸铵)，0.1% 甲酸，所有化合物峰型理想，响应值没有出现显著下降。因此选择该条件进行方法优化。对于有机试剂，甲醇在离子化效率较乙腈要好，并且还能为碱性化合物提供良好的峰型<sup>[13]</sup>。

考虑到分析物的强极性保留，本实验室所采用的C30色谱柱，保留性较普通C18色谱柱要强，并且能耐纯水相条件，在核苷酸对保留方面发挥了很好的效果，结合优化的流动相，使得核苷酸在色谱柱上的实现了很好的保留，并且较已发表的文献峰型明显良好<sup>[2, 3, 6]</sup>。

## Reference

1. Coulier, L., et al., Simultaneous quantitative analysis of metabolites using ion-pair liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry. *Anal Chem*, 2006. **78**(18): p. 6573-82.
2. Fromentin, E., et al., Simultaneous quantification of intracellular natural and antiretroviral nucleosides and nucleotides by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Anal Chem*, 2010. **82**(5): p. 1982-9.
3. Inoue, K., et al., Development and application of an HILIC-MS/MS method for the quantitation of nucleotides in infant formula. *J Agric Food Chem*, 2010. **58**(18): p. 9918-24.



4. Jansen, R.S., et al., Mass spectrometry in the quantitative analysis of therapeutic intracellular nucleotide analogs. *Mass Spectrom Rev*, 2011. **30**(2): p. 321-43.
5. Neubauer, S., et al., Mass spectrometry based analysis of nucleotides, nucleosides, and nucleobases--application to feed supplements. *Anal Bioanal Chem*, 2012. **404**(3): p. 799-808.
6. Ren, Y., et al., Simultaneous Determination of 5'-Monophosphate Nucleotides in Infant Formulas by HPLC-MS. *Journal of Chromatographic Science*, 2011. **49**(4): p. 332-337.
7. Viñas, P., et al., Ion-pair high-performance liquid chromatography with diode array detection coupled to dual electrospray atmospheric pressure chemical ionization time-of-flight mass spectrometry for the determination of nucleotides in baby foods. *Journal of Chromatography A*, 2010. **1217**(32): p. 5197-5203.
8. Yamaoka, N., et al., Simultaneous determination of nucleosides and nucleotides in dietary foods and beverages using ion-pairing liquid chromatography-electrospray ionization-mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2010. **878**(23): p. 2054-60.
9. Yang, F.Q., et al., Determination of nucleotides, nucleosides and their transformation products in Cordyceps by ion-pairing reversed-phase liquid chromatography-mass spectrometry. *J Chromatogr A*, 2010. **1217**(34): p. 5501-10.
10. Cohen, S., et al., Liquid chromatographic methods for the determination of endogenous nucleotides and nucleotide analogs used in cancer therapy: a review. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2010. **878**(22): p. 1912-28.
11. Gustavsson, S.A., et al., Studies of signal suppression in liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry using volatile ion-pairing reagents. *J Chromatogr A*, 2001. **937**(1-2): p. 41-7.
12. Gill, B.D. and H.E. Indyk, Determination of nucleotides and nucleosides in milks and pediatric formulas: a review. *JAOAC Int*, 2007. **90**(5): p. 1354-64.
13. 金亚超, 牟余., 体内药物分析中影响 LC-ESI-MS 离子化的因素. *国际药学研究杂志*, 2011. **38**(2): p. 5.