

16种核苷与核苷酸 LC 检测方法的建立及质谱裂解规律的研究

赵明娟¹, 顾霄^{2*}, 郑金琪^{2*} (1.杭州中美华东制药有限公司, 杭州 310015; 2.浙江省食品药品检验研究院, 浙江省药品接触材料质量控制重点实验室, 国家药品监督管理局仿制药评估关键技术重点实验室, 杭州 310052)

摘要: 目的 建立通用 LC-MS 法用于分离和鉴定核苷(酸)化合物。方法 选用 ODS-AQ 柱, 流动相 A 为缓冲液 1(120 mmol·L⁻¹ Na₂HPO₄, 120 mmol·L⁻¹ KH₂PO₄ 和 3 mmol·L⁻¹ TBAOH), 流动相 B 为水, 流动相 C 为甲醇, 梯度洗脱, 对 16 种核苷和核苷酸化合物进行分离分析。采用电喷雾离子化(ESI)检测, 喷雾电压 4 000 V(正离子模式)/3 500 V(负离子模式), 雾化气压力 45 psi, 干燥气流量 10 L·min⁻¹, 去溶剂温度 350 °C。碎裂电压为 180 V, 碰撞能量设置为 5~30 eV, 对 4 种不同类型的核苷和核苷酸化合物的质谱碎片进行分析。结果 建立的 LC 方法对 16 个代表性核苷(酸)化合物达到了基线分离($R>2.0$), 基于质谱碎片规律, 构建核苷(酸)化合物的质谱平台。结论 建立的 LC-MS 方法可为未知的核苷(酸)化合物的分离与鉴定提供参考。

关键词: 液相色谱-质谱; 核苷(酸)化合物; 基线分离; 质谱平台

中图分类号: R917 文献标志码: B 文章编号: 1007-7693(2022)20-2614-08

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2022.20.007

引用本文: 赵明娟, 顾霄, 郑金琪. 16 种核苷与核苷酸 LC 检测方法的建立及质谱裂解规律的研究[J]. 中国现代应用药学, 2022, 39(20): 2614-2621.

Establishment of LC Methods for 16 Nucleosides and Nucleotides and the Study of Cleavage Law by Mass Spectrometry

ZHAO Mingjuan¹, GU Xiao^{2*}, ZHENG Jinqi^{2*} (1. Hangzhou Zhongmeihuadong Pharmaceutical Co., Ltd., Hangzhou 310015, China; 2. Zhejiang Institute for Food and Drug Control, Key Laboratory of Drug Contacting Materials Quality Control of Zhejiang Provincial, Key Laboratory for Core Technology of Generic Drug Evaluation National Medical Product Administration, Hangzhou 310052, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To establish a general LC-MS method for the separation and identification of nucleoside and nucleotide compounds. **METHODS** The ODS-AQ column was picked, the mobile phase A was buffer 1(120 mmol·L⁻¹ Na₂HPO₄, 120 mmol·L⁻¹ KH₂PO₄ and 3 mmol·L⁻¹ TBAOH), the mobile phase B was water, and the mobile phase C was methanol, gradient elution. The 16 nucleoside and nucleotide compounds were separated and analyzed. Electrospray ionization (ESI) detection was adopted, spray voltage was 4 000 V (positive ion mode)/3 500 V (negative ion mode), atomizing gas pressure was 45 psi, drying gas flow rate was 10 L·min⁻¹, and solvent removal temperature was 350 °C. The fragmentation voltage was 180 V, and the collision energy was set to 5–30 eV. Mass spectrometry fragments of 4 different types of nucleoside and nucleotide compounds were analyzed. **RESULTS** The established LC method achieved baseline separation($R>2.0$) for 16 representative nucleoside and nucleotide compounds. Based on the mass spectrum fragmentation rule, a mass spectrometry platform for nucleoside and nucleotide compounds was constructed. **CONCLUSION** The established LC-MS method can provide reference for the separation and identification of unknown nucleoside and nucleotide compounds.

KEYWORDS: LC-MS; nucleosides and nucleotides compounds; baseline separation; mass spectrometry platform

核苷由嘌呤或嘧啶碱与戊糖缩合而成, 核苷酸是核苷的磷酸酯。核苷和核苷酸是 DNA 和 RNA 的基本组成单位, 具有重要的生物学功能, 参与了生物体内几乎所有的生物化学反应过程^[1]。核苷与核苷酸的测定在生化、医药、食品、代谢组学等^[2-6]各领域有广泛的应用。

核苷与核苷酸的测定一直是分析技术的难点, 原因在于该类化合物绝大多数为强极性小分子化

合物, 在传统反相色谱上保留极弱, 且由于结构相近难以有效分离, Chen 等^[7]曾尝试用磷酸盐缓冲液对 19 种碱基和核苷进行色谱分离, 但分离结果不理想。随着色谱技术的发展, 出现了很多针对强极性物质的色谱填料, 如 HILIC 柱^[8-13]、混合模式色谱柱以及特殊键合的 C₁₈ 柱^[14-15]。有不同机构研究者采用多种色谱方法对生物样品、食品和药品中的核苷酸及相关物质进行测定研究, 但同时分离测定

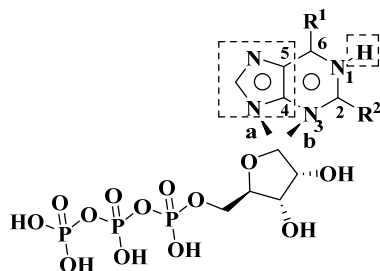
基金项目: 浙江省基础公益研究计划(LGF19H300001)

作者简介: 赵明娟, 女, 硕士 E-mail: 847051592@qq.com
顾霄, 男, 硕士, 主管药师 E-mail: guxiaoj@aliyun.com

*通信作者: 郑金琪, 男, 硕士, 主任药师 E-mail: zjq@zjyj.org.cn

多种类型的核苷和核苷酸的报道较少。

目前,高分辨质谱在未知化合物结构鉴定方面有了极其广泛的应用,通过对一类化合物质谱裂解规律的研究,可对同类型未知化合物的结构鉴定提供很好的参考依据。本研究旨在建立一种可有效分离 16 种核苷和核苷酸的高效液相色谱-质谱联用法,为该类化合物的定性研究提供参考依据,并对以上化合物的质谱裂解行为进行研究,以为同类型其他化合物的定性研究提供技术支持。化学结构见图 1。



名称	碱基	R ¹	R ²	-P
腺苷, 一/二/三磷酸腺苷	a	NH ₂	H	0/1/2/3
胞苷, 一/二/三磷酸胞苷	b	NH ₂	O	0/1/2/3
鸟苷, 一/二/三磷酸鸟苷	a	O	NH ₂	0/1/2/3
尿苷, 一/二/三磷酸尿苷	b	O	O	0/1/2/3

图 1 16 个核苷(酸)化合物的化学结构式

Fig. 1 Chemical structure of 16 nucleosides and nucleotides compounds

1 仪器与试剂

UltiMate 3000 高效液相色谱仪(美国 Thermo)配有 CAD 检测器(Corona Ultra RS),质谱分析使用美国 Agilent 配备了电喷雾电离(ESI)源的 6 538 UHD 精确质量四极杆飞行时间质谱仪(Q-TOF MS)。色谱柱为 Boston Green ODS-AQ 柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm); XPE 205 分析天平(瑞士梅特勒公司)。

磷酸氢二钠、磷酸二氢钾、四丁基氢氧化铵(TBAOH, 10%水溶液)(分析纯)均购自国药集团化学试剂有限公司,甲醇(色谱纯,美国西格玛奥德里有限公司),水为超纯水;对照品:一磷酸腺苷(AMP,批号:L20190328-4;纯度:98.8%)、二磷酸腺苷一钾(ADP-K,批号:L20190328-5;纯度:97.3%)、三磷酸腺苷二钠(ATP-Na₂,批号:L20190328-6;纯度:97.0%)、三磷酸胞苷二钠(CTP-Na₂,批号:141019;纯度:99.5%)、一磷酸鸟苷二钠(GMP-Na₂,批号:L20190328-7;纯度:99.5%)、二磷酸鸟苷二钠(GDP-Na₂,批号:

L20190328-8;纯度:90.1%)、三磷酸鸟苷二钠(GTP-Na₂,批号:L20190328-9;纯度:89.8%)、一磷酸尿苷二钠(UMP-Na₂,批号:L20190328-1;纯度:99.8%)、二磷酸尿苷二钠(UDP-Na₂,批号:L20190328-2;纯度:97.7%)、三磷酸尿苷二钠(UTP-Na₂,批号:L20190328-3;纯度≥95%)均购自杭州美亚药业股份有限公司;腺苷(A,批号:110879-201703;纯度:99.7%)、鸟苷(G,批号:111977-201501;纯度:93.6%)、胞嘧啶(批号:420017-201702;纯度:99.8%)、尿苷(U,批号:110887-201803;纯度:99.5%)均购自中国食品药品检定研究院;胞苷(C,批号:S18058;纯度:99%)、二磷酸胞苷二钠(CDP-Na₂,批号:S48189;纯度:98%)、一磷酸胞苷二钠(CMP-Na₂,批号:S18060;纯度:98%)、三磷酸尿苷二钠(UTP-Na₂,批号:S30956;纯度:98%)均购自上海源叶生物科技有限公司。

2 方法

2.1 溶液的制备

分别称取“1”项下对照品各约 10 mg,分别置 10 mL 量瓶中,加水溶解并稀释至刻度,摇匀,作为各自对照品溶液。精密量取以上各对照品溶液 1.0 mL,置 20 mL 量瓶中,用水稀释至刻度,摇匀,作为分析研究溶液。

2.2 液相色谱条件和质谱条件

2.2.1 液相色谱条件 选用 ODS-AQ 柱,流动相 A 为缓冲液 1(120 mmol·L⁻¹ Na₂HPO₄, 120 mmol·L⁻¹ KH₂PO₄ 和 3 mmol·L⁻¹ TBAOH),流动相 B 为水,流动相 C 为甲醇,梯度洗脱程序:0 min, A : B : C=20 : 0 : 80; 50 min, A : B : C=20 : 0 : 80; 70 min, A : B : C=97 : 3 : 0; 90 min, A : B : C=97 : 3 : 0。

2.2.2 质谱条件 电喷雾离子化(ESI)检测,喷雾电压 4 000 V(正离子模式)/3 500 V(负离子模式),雾化气压力 45 psi,干燥气流量 10 L·min⁻¹,去溶剂温度 350 °C。碎裂电压为 180 V,碰撞能量设置为 5~30 eV。

取“2.1”项下各化合物对照品溶液以直接输注方式注入质谱仪,考察质谱行为。

3 结果

3.1 色谱条件的摸索

对于 ODS-AQ 柱,固定相采用封尾技术可更好地掩蔽硅胶上的残余硅羟基,使得其表面更具疏水性,因此流动相中 pH 的影响可忽略不计^[16]。

然而,水相-有机相的比例、缓冲盐和离子对试剂的浓度对核苷(酸)化合物的色谱分离有很大影响。实验结果显示甲醇含量增加,虽然会明显改善分析时间,但会导致更差的分离效果,尤其是甲醇比例>10%,见图2a。

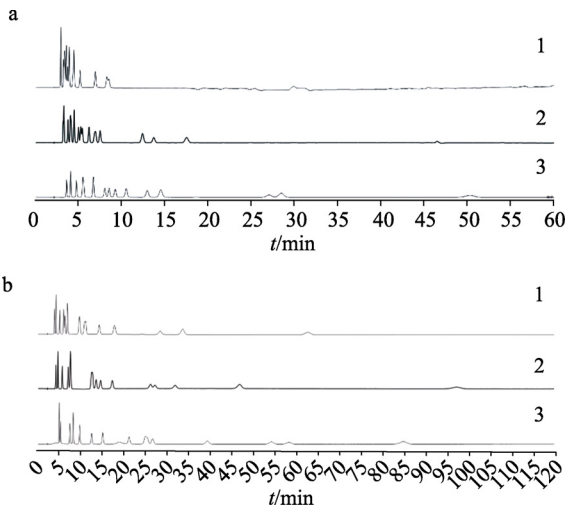


图2 16个核苷(酸)化合物的液相色谱图
 色谱条件: a-1: 缓冲液 1-甲醇-水=100:0:0; a-2: 缓冲液 1-甲醇-水=95:5:0; a-3: 缓冲液 1-甲醇-水=90:10:0; b-1: 缓冲液 1-甲醇-水=80:0:20; b-2: 缓冲液 1-甲醇-水=60:0:40; b-3: 缓冲液 1-甲醇-水=40:0:60。

Fig. 2 LC chromatograms of 16 nucleosides and nucleotides
 Chromatographic conditions: a-1: buffer 1-methanol-water=100:0:0; a-2: buffer 1-methanol-water=95:5:0; a-3: buffer 1-methanol-water=90:10:0; b-1: buffer 1-methanol-water=80:0:20; b-2: buffer 1-methanol-water=60:0:40; b-3: buffer 1-methanol-water=40:0:60.

此外,磷酸盐缓冲液及离子对试剂的浓度与待测组分的保留相关,它们的浓度降低会使得核苷(酸)化合物的保留有所增强,且改善待测组分的分离,但浓度过低,会导致较长的分析时间,见图2b。建立适宜的梯度洗脱程序优化对16个核苷(酸)化合物的分离:使用低浓度的缓冲液1对前10个化合物进行考察,见图3,流动相条件为缓冲液1-甲醇-水(A:B:C=20:0:80)时显示出较好的分离效果($R>2.0$),并将这一流动相称为流动相A;考虑到部分核苷(酸)化合物相近的化学性质和梯度洗脱前后流动相差异较大,适当延长平衡时间并设置为20 min;在前面流动相研究的基础上,调整流动相组成以完成后6个化合物的分离,见图4。结果显示,16个核苷(酸)化合物得到完全的分离($R>2.0$),见图5,且没有明显的混合标准溶液峰的拖尾现象。

结果表明,在梯度洗脱程序中缓冲溶液浓度降低虽然会增强核苷(酸)化合物的保留,但会改善色

谱峰基线[以图5的色谱条件为例,其展示了16个核苷(酸)化合物的定位,保留时间:1-C<2-CMP<3-U<4-UMP<5-GMP<6-G<7-CDP<8-AMP<9-UDP<10-A<11-GDP<12-CTP<13-UTP<14-GTP<15-ADP<16-ATP]。ODS柱与待测组分主要发生疏水相互作用,这种作用与16种化合物的极性相关,通常地,随着磷酸基团数目的增加化合物极性增强,但除了AMP和A,GMP和G。4种类型的核苷(酸)化合物极性:C(NP)<U(NP)<G(NP)<A(NP)。

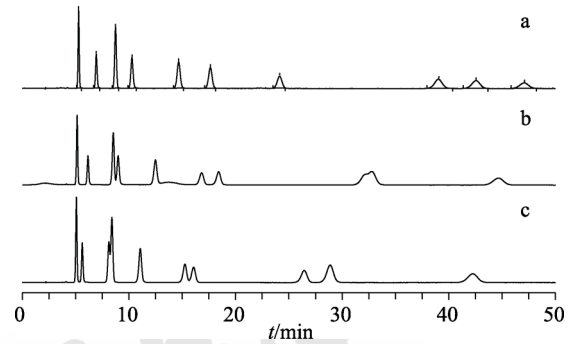


图3 前10个核苷(酸)化合物的液相色谱图
 色谱条件: a-缓冲液 1-甲醇-水=20:0:80; b-缓冲液 1-甲醇-水=25:0:75; c-缓冲液 1-甲醇-水=30:0:70。

Fig. 3 LC chromatograms of the former 10 nucleosides and nucleotides
 Chromatographic conditions: a-buffer 1-methanol-water=20:0:80; b-buffer 1-methanol-water=25:0:75; c-buffer 1-methanol-water=30:0:70.

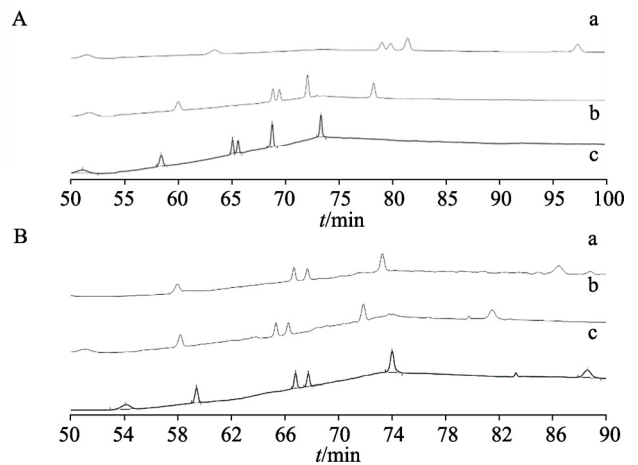


图4 后6个化合物的液相色谱图
 色谱条件: A-a: 缓冲液 1-甲醇-水=80:10:10; A-b: 缓冲液 1-甲醇-水=50:10:40; A-c: 缓冲液 1-甲醇-水=20:10:70; B-a: 缓冲液 1-甲醇-水=97:3:0; B-b: 缓冲液 1-甲醇-水=95:5:0; B-c: 缓冲液 1-甲醇-水=80:5:15。

Fig. 4 LC chromatograms of the latter 6 nucleosides and nucleotides
 Chromatographic conditions: A-a: buffer 1-methanol-water=80:10:10; A-b: buffer 1-methanol-water=50:10:40; A-c: buffer 1-methanol-water=20:10:70; B-a: buffer 1-methanol-water=97:3:0; B-b: buffer 1-methanol-water=95:5:0; B-c: buffer 1-methanol-water=80:5:15.

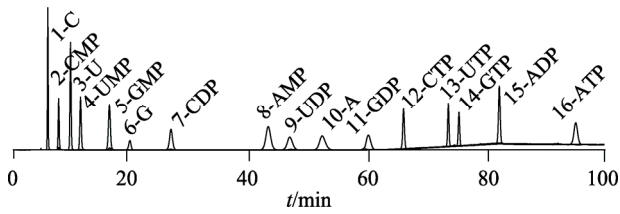


图 5 16 个核苷(酸)化合物的定位

Fig. 5 Location of 16 nucleosides and nucleotides

表 1 正离子模式下核苷化合物的 MS/MS 值

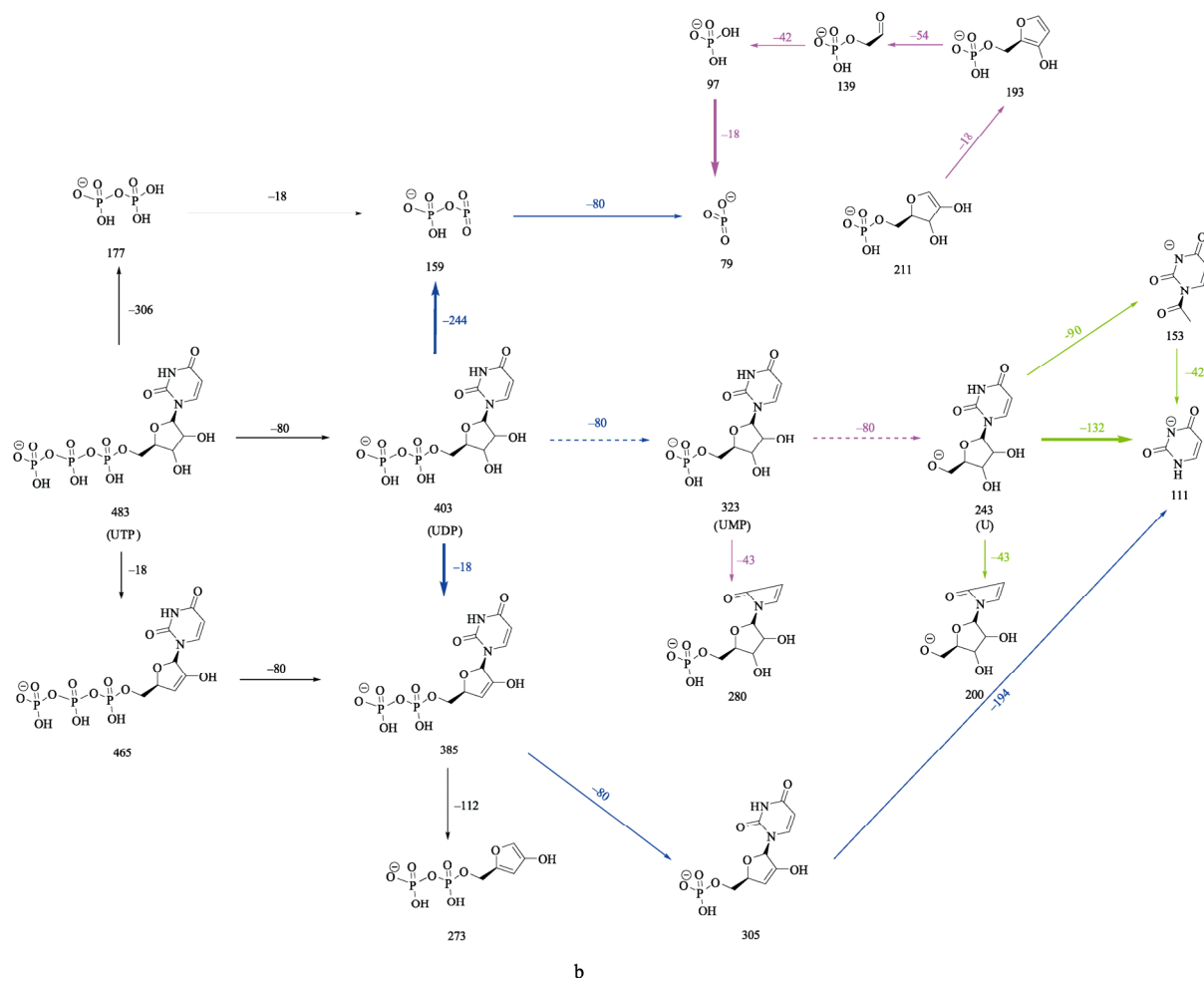
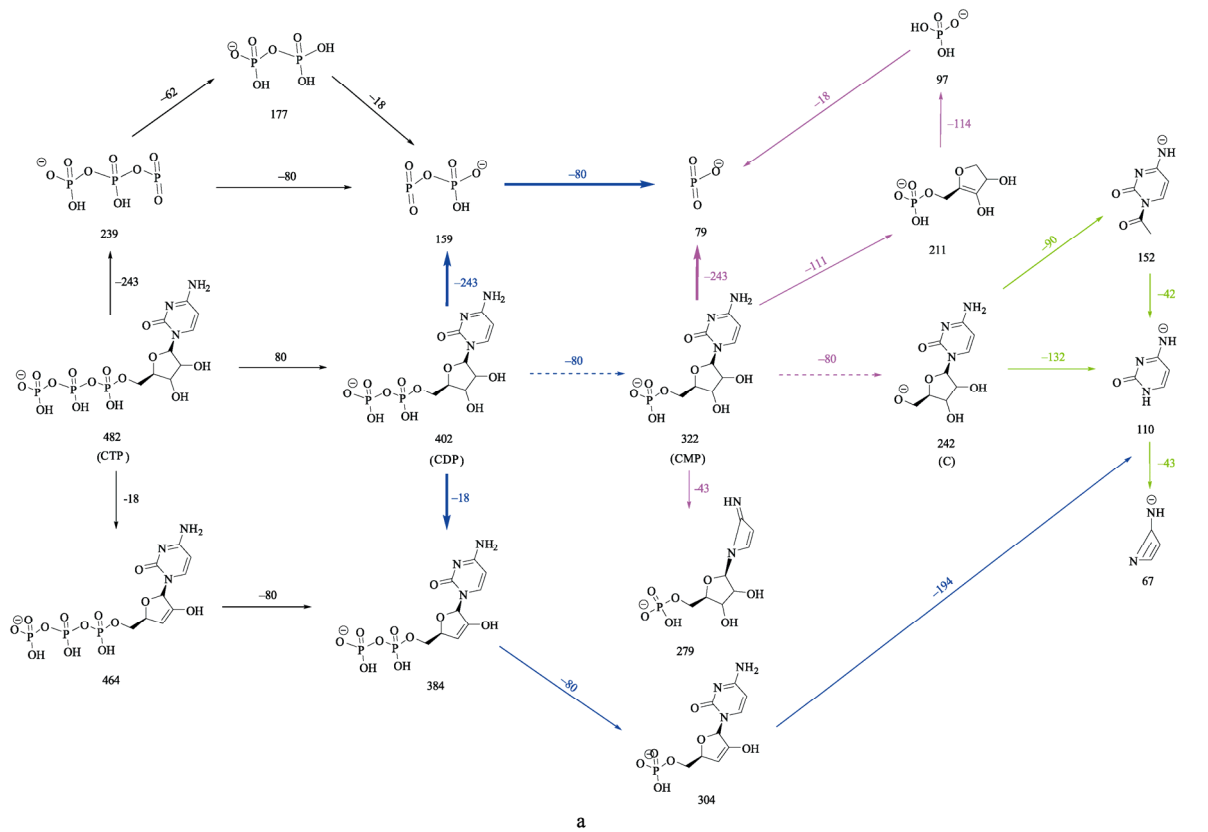
Tab. 1 MS/MS data of nucleosides in positive ion mode

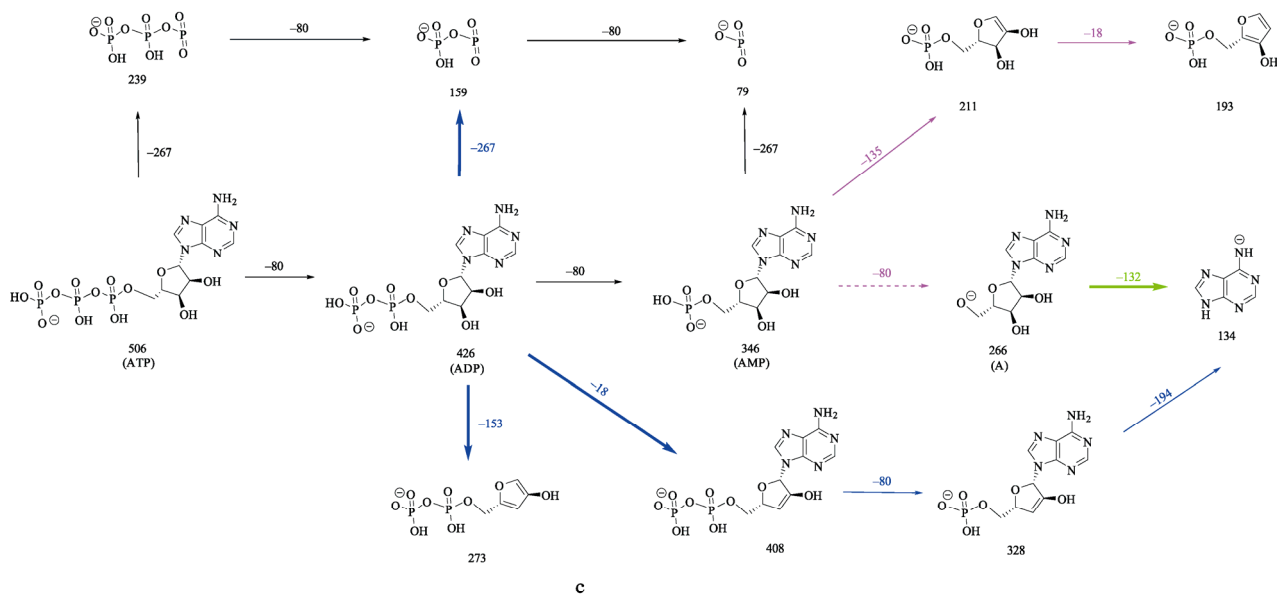
母离子	碎片离子	测得质量数	实际质量数	化学式	误差	母离子	碎片离子	测得质量数	实际质量数	化学式	误差
268(A)	-	268.104 3	268.104 0	C ₁₀ H ₁₄ N ₅ O ₄ ⁺	1.1	484(CTP)	-	483.991 9	483.991 8	C ₉ H ₁₇ N ₅ O ₁₄ P ₃ ⁺	0.2
	136	136.061 3	136.061 8	C ₅ H ₆ N ₅ ⁺	-3.7		324	324.058 8	324.059 1	C ₉ H ₁₅ N ₅ O ₈ P ⁺	-0.9
348(AMP)	-	348.068 7	348.070 4	C ₁₀ H ₁₃ N ₅ O ₇ P ⁺	-4.9		112	112.051 0	112.050 5	C ₄ H ₆ N ₃ O ⁺	4.5
	136	136.060 7	136.061 8	C ₅ H ₆ N ₅ ⁺	-8.1	284(G)	-	284.098 1	284.098 9	C ₁₀ H ₁₄ N ₅ O ₅ ⁺	-2.8
244(C)	-	244.092 8	244.092 8	C ₉ H ₁₄ N ₃ O ₅ ⁺	0.0		152	152.056 5	152.056 7	C ₅ H ₄ N ₃ O ⁺	-1.3
	112	112.050 8	112.050 5	C ₄ H ₆ N ₃ O ⁺	2.7	245(U)	-	245.076 5	245.076 8	C ₉ H ₁₃ N ₂ O ₆ ⁺	-1.2
324(CMP)	-	324.057 6	324.059 1	C ₉ H ₁₃ N ₃ O ₈ P ⁺	-4.6		113	113.034 0	113.034 6	C ₄ H ₅ N ₂ O ₂ ⁺	-5.3
	112	112.050 0	112.050 5	C ₄ H ₆ N ₃ O ⁺	-4.5						

表 2 负离子模式下核苷酸化合物的 MS/MS 值

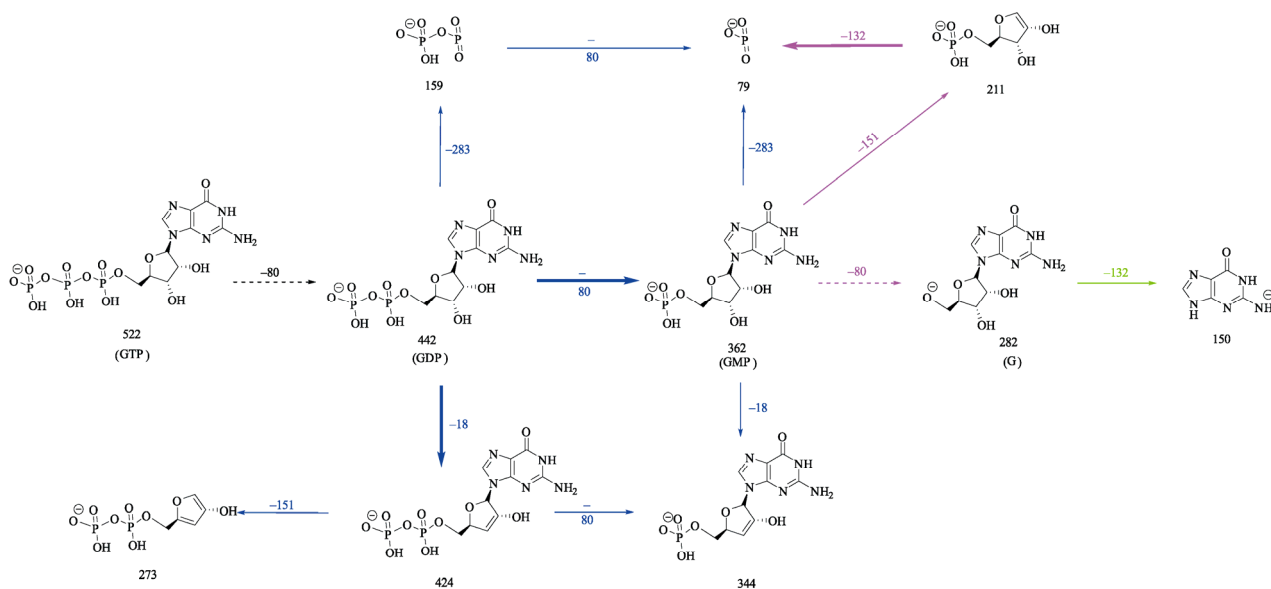
Tab. 2 MS/MS data of nucleotides in negative ion mode

母离子	碎片离子	测得质量数	实际质量数	化学式	误差	母离子	碎片离子	测得质量数	实际质量数	化学式	误差
266(A)	-	266.089 6	266.089 5	C ₁₀ H ₁₂ N ₅ O ₄ ⁻	0.4	282(G)	-	282.085 0	282.084 4	C ₁₀ H ₁₂ N ₅ O ₅ ⁻	2.1
	134	134.047 5	134.047 2	C ₅ H ₄ N ₅ ⁻	2.2		150	150.042 2	150.042 2	C ₅ H ₄ N ₅ O ⁻	0.0
346(AMP)	-	346.057 2	346.055 8	C ₁₀ H ₁₃ N ₅ O ₇ P ⁻	4.0	362(GMP)	-	362.051 3	362.050 7	C ₁₀ H ₁₃ N ₅ O ₈ P ⁻	1.7
	211	211.001 8	211.001 3	C ₅ H ₈ O ₇ P ⁻	2.4		211	211.001 7	211.001 3	C ₅ H ₈ O ₇ P ⁻	1.9
	193	192.990 6	192.990 7	C ₅ H ₆ O ₆ P ⁻	-0.5		79	78.959 5	78.959 1	O ₃ P ⁻	5.1
	134	134.047 6	134.047 2	C ₅ H ₄ N ₅ ⁻	3.0	442(GDP)	-	442.017 9	442.017 1	C ₁₀ H ₁₄ N ₅ O ₁₁ P ₂ ⁻	1.8
426(ADP)	-	426.022 9	426.022 1	C ₁₀ H ₁₄ N ₅ O ₁₀ P ₂ ⁻	1.9		424	424.005 3	424.006 5	C ₁₀ H ₁₂ N ₅ O ₁₀ P ₂ ⁻	-2.8
	408	408.010 0	408.011 6	C ₁₀ H ₁₂ N ₅ O ₉ P ₂ ⁻	-3.9		362	362.051 1	362.050 7	C ₁₀ H ₁₃ N ₅ O ₈ P ⁻	1.1
	328	328.047 9	328.045 2	C ₁₀ H ₁₁ N ₅ O ₆ P ⁻	8.2		344	344.040 9	344.040 2	C ₁₀ H ₁₁ N ₅ O ₇ P ⁻	2.0
	273	272.955 7	272.957 1	C ₅ H ₈ O ₉ P ₂ ⁻	-5.1		273	272.955 8	272.957 1	C ₅ H ₈ O ₉ P ₂ ⁻	-4.8
	159	158.924 5	158.925 4	HO ₆ P ₂ ⁻	-5.7		159	158.925 1	158.925 4	HO ₆ P ₂ ⁻	-1.9
	134	134.047 7	134.047 2	C ₅ H ₄ N ₅ ⁻	3.7		79	78.959 1	78.959 1	O ₃ P ⁻	0.0
506(ATP)	-	505.989 8	505.988 5	C ₁₀ H ₁₅ N ₅ O ₁₃ P ₃ ⁻	2.6	522(GTP)	-	521.980 4	521.983 4	C ₁₀ H ₁₅ N ₅ O ₁₄ P ₃ ⁻	-5.7
	426	426.022 9	426.022 1	C ₁₀ H ₁₄ N ₅ O ₁₀ P ₂ ⁻	1.9		424	424.005 7	424.006 5	C ₁₀ H ₁₂ N ₅ O ₁₀ P ₂ ⁻	-1.9
	408	408.012 3	408.011 6	C ₁₀ H ₁₂ N ₅ O ₉ P ₂ ⁻	1.7		362	362.053 9	362.050 7	C ₁₀ H ₁₃ N ₅ O ₈ P ⁻	8.8
	346	346.058 3	346.055 8	C ₁₀ H ₁₃ N ₅ O ₇ P ⁻	7.2		150	150.041 7	150.042 1	C ₅ H ₄ N ₅ O ⁻	-2.7
	273	272.957 5	272.957 1	C ₅ H ₈ O ₉ P ₂ ⁻	1.5	243(U)	-	243.062 2	243.062 3	C ₉ H ₁₁ N ₂ O ₆ ⁻	-0.4
	239	238.893 4	238.891 7	H ₂ O ₉ P ₃ ⁻	7.1		200	200.056 6	200.056 6	C ₈ H ₁₀ NO ₅ ⁻	0.0
	159	158.925 6	158.925 4	HO ₆ P ₂ ⁻	1.3		153	153.030 5	153.030 6	C ₆ H ₆ N ₂ O ₃ ⁻	-0.7
	79	78.959 3	78.959 1	O ₃ P ⁻	2.5		111	111.019 8	111.020 0	C ₄ H ₃ N ₃ O ₂ ⁻	-1.8
242(C)	-	242.078 9	242.078 2	C ₉ H ₁₂ N ₃ O ₅ ⁻	2.9	323(UMP)	-	323.028 5	323.028 6	C ₉ H ₁₂ N ₂ O ₉ P ⁻	-0.3
	152	152.046 3	152.046 6	C ₆ H ₆ N ₃ O ₂ ⁻	-2.0		280	280.023 3	280.022 8	C ₈ H ₁₁ NO ₈ P ⁻	1.8
	110	110.036 0	110.036 0	C ₄ H ₄ N ₃ O ⁻	0.0		211	211.000 9	211.001 3	C ₅ H ₈ O ₇ P ⁻	-1.9
	67	67.029 7	67.030 2	C ₃ H ₃ N ₂ ⁻	-7.5		193	192.991 6	192.990 7	C ₅ H ₆ O ₆ P ⁻	4.7
322(CMP)	-	322.046 8	322.044 6	C ₉ H ₁₃ N ₃ O ₈ P ⁻	6.8		139	138.980 1	138.980 2	C ₂ H ₄ O ₅ P ⁻	-0.7
	279	279.040 4	279.038 8	C ₈ H ₁₂ N ₂ O ₇ P ⁻	5.7		111	111.020 4	111.020 0	C ₄ H ₃ N ₂ O ₂ ⁻	3.6
	211	211.001 6	211.001 3	C ₅ H ₈ O ₇ P ⁻	1.4		97	96.969 5	96.969 6	H ₂ O ₄ P ⁻	-1.0
	97	96.970 3	96.969 6	H ₂ O ₄ P ⁻	7.2		79	78.959 0	78.959 1	O ₃ P ⁻	-1.3
	79	78.959 4	78.959 1	O ₃ P ⁻	3.8	403(UDP)	-	402.995 8	402.994 9	C ₉ H ₁₃ N ₂ O ₁₂ P ₂ ⁻	2.2
402(CDP)	-	402.013 0	402.010 9	C ₉ H ₁₄ N ₃ O ₁₁ P ₂ ⁻	5.2		385	384.983 3	384.984 4	C ₉ H ₁₁ N ₂ O ₁₁ P ₂ ⁻	-2.9
	384	384.001 2	384.000 3	C ₉ H ₁₂ N ₃ O ₁₀ P ₂ ⁻	2.3		305	305.019 3	305.018 0	C ₉ H ₁₀ N ₂ O ₈ P ⁻	4.3
	304	304.034 8	304.034 0	C ₉ H ₁₁ N ₃ O ₇ P ⁻	2.6		159	158.925 0	158.925 4	HO ₆ P ₂ ⁻	-2.5
	159	158.925 5	158.925 4	HO ₆ P ₂ ⁻	0.6		111	111.020 1	111.020 0	C ₄ H ₃ N ₂ O ₂ ⁻	0.9
	110	110.035 9	110.036 0	C ₄ H ₄ N ₃ O ⁻	-0.9		79	78.958 9	78.959 1	O ₃ P ⁻	-2.5
	79	78.959 4	78.959 1	O ₃ P ⁻	3.8	483(UTP)	-	482.962 9	482.961 3	C ₉ H ₁₄ N ₂ O ₁₅ P ₃ ⁻	3.3
482(CTP)	-	481.978 9	481.977 2	C ₉ H ₁₃ N ₃ O ₁₄ P ₃ ⁻	3.5		465	464.952 0	464.950 7	C ₉ H ₁₂ N ₂ O ₁₄ P ₃ ⁻	2.8
	464	463.964 8	463.966 7	C ₉ H ₁₃ N ₃ O ₁₃ P ₃ ⁻	-4.1		403	402.997 3	402.994 9	C ₉ H ₁₃ N ₂ O ₁₂ P ₂ ⁻	6.0
	402	402.010 5	402.010 9	C ₉ H ₁₄ N ₃ O ₁₁ P ₂ ⁻	-1.0		385	384.981 3	384.984 4	C ₉ H ₁₁ N ₂ O ₁₁ P ₂ ⁻	-8.1
	384	384.001 9	384.000 3	C ₉ H ₁₂ N ₃ O ₁₀ P ₂ ⁻	4.2		273	272.959 0	272.957 1	C ₅ H ₈ O ₉ P ₂ ⁻	7.0
	239	238.890 4	238.891 7	H ₂ O ₉ P ₃ ⁻	-5.4		177	176.935 6	176.935 9	H ₃ O ₇ P ₂ ⁻	-1.7
	177	176.936 3	176.935 9	H ₃ O ₇ P ₂ ⁻	2.3		159	158.924 2	158.925 4	HO ₆ P ₂ ⁻	-7.6
	159	158.925 5	158.925 4	HO ₆ P ₂ ⁻	0.6						
	79	78.959 2	78.959 1	O ₃ P ⁻	1.3						





c



d

图6 负离子模式下16个代表性的核苷(酸)化合物可能的碎裂途径

a-C和CNP; b-U和UNP; c-A和ANP; d-G和GNP

→: NTP中的碎片; →: NDP中的碎片; →: NMP中的碎片; →: N中的碎片; →: NTP和NDP中的相同碎片; →: NDP和NMP中的相同碎片; →: NMP和N中的相同碎片; - - - - -: 未形成碎片。

Fig. 6 Plausible fragmentation pathways of 16 representative nucleosides and nucleotides in negative ion mode

a-C and CNP; b-U and UNP; c-A and ANP; d-G and GNP

→: fragments in NTP; →: fragments in NDP; →: fragments in NMP; →: fragments in N; →: fragments in NTP and NDP; →: fragments in NDP and NMP; →: fragments in NMP and N; - - - - -: No fragments formed.

NTP(N代表A、T、C、G,后同)的MS/MS谱图中显示大量的碎片离子NDP([M-H]⁻)或/和NMP([M-H]⁻)或/和N([M-H]⁻),这是由于前体离子分别失去1/2/3个磷酸残基(80/160/240 Da),NDP和NMP也有着相似的碎片裂解途径。作为去质子化的和碱基相应地是从N中失去132 Da的核糖基团。而NTP、NDP和NMP失去核苷基团而在m/z

239, 159和79处观察到相应碎片离子的形成。此外,还有一些特殊的碎片裂解途径:m/z 279和m/z 67碎片离子可以用来解释CMP([M-H]⁻),m/z 322和m/z 110中嘧啶环中酰胺基团的裂解和重排;m/z 280和m/z 200碎片离子的形成是UMP([M-H]⁻),m/z 323和U([M-H]⁻),m/z 243中嘧啶环残基的裂解及重排引起的。

表 3 5 种色谱柱对 16 个核苷(酸)化合物的分离情况

Tab. 3 Separation behavior of 16 nucleosides and nucleotides in 5 columns

色谱柱	流动相	运行时间/min	峰的个数	备注
Atlantis T3	100 mmol·mL ⁻¹ NH ₄ Ac	50	2	
	80 mmol·mL ⁻¹ NH ₄ Ac	92	10	
	60/40/20/10 mmol·mL ⁻¹ NH ₄ Ac	50	13/13/14/13	大多数化合物不保留
	ACN: 20 mmol·mL ⁻¹ NH ₄ Ac(5 : 95)	40	12	
	ACN: 20 mmol·mL ⁻¹ NH ₄ Ac(10 : 90)	14	10	
HILIC Silica	ACN: 100/50/20 mmol·mL ⁻¹ NH ₄ Ac(90 : 10)	13/13/12	4/4/4	大多数化合物分不开
	ACN: 100/50 mmol·mL ⁻¹ NH ₄ Ac(80 : 20)	8/8	4/4	
	ACN: 100/50/20 mmol·mL ⁻¹ NH ₄ Ac(60 : 40)	8/7/5	8/7/8	
	ACN: 100 mmol·mL ⁻¹ NH ₄ Ac(40 : 60)	5	4	部分化合物分不开, 其他化合物不保留
	ACN: 20 mmol·mL ⁻¹ NH ₄ Ac(80 : 20)	5	8	
HILIC-Z	ACN: 100 mmol·mL ⁻¹ NH ₄ Ac(60 : 40)	3	5	
	ACN: 20 mmol·mL ⁻¹ NH ₄ Ac(40 : 60)	10	2	化合物分不开
XB-NH ₂	MeOH: 100/50/20 mmol·mL ⁻¹ NH ₄ Ac(90 : 10)	5/6/6	3/3/3	
	MeOH: 100/50/20 mmol·mL ⁻¹ NH ₄ Ac(80 : 20)	5/5/5	2/3/2	
	MeOH: 100/50 mmol·mL ⁻¹ NH ₄ Ac(60 : 40)	4/5	2/2	
	MeOH: 100 mmol·mL ⁻¹ NH ₄ Ac(40 : 60)	4	2	部分化合物分不开, 其他化合物不保留
	MeOH: 50 mmol·mL ⁻¹ NH ₄ Ac(40 : 60)	5	2	
	ACN: 50 mmol·mL ⁻¹ NH ₄ Ac(90 : 10)	23	4	
	ACN: 50 mmol·mL ⁻¹ NH ₄ Ac(80 : 20)	9	3	
BEH HILIC	MeOH: 100 mmol·mL ⁻¹ NH ₄ Ac(90 : 10)	5	2	
	MeOH: 100 mmol·mL ⁻¹ NH ₄ Ac(60 : 40)	4	1	大多数化合物不保留
	MeOH: 20 mmol·mL ⁻¹ NH ₄ Ac(80 : 20)	4	3	
	MeOH: 20 mmol·mL ⁻¹ NH ₄ Ac(40 : 60)	4	4	

核苷酸化合物主要由 3 个结构单元组成: 核碱基单元、糖苷单元及磷酸单元。在碰撞电压作用下, 该类化合物呈现如下裂解规律: ①磷酸单元易发生多级断裂, 形成脱去 1~3 个磷酸结构的碎片离子及相应的磷酸碎片; ②糖苷键易发生断裂, 形成脱核碱基碎片和碱基碎片离子; ③糖环易发生脱水反应。

4 讨论

本研究首先考察了亲水色谱法(HILIC Silica 柱, HILIC-Z 柱, Welch XB-NH₂ 柱和 BEH HILIC 柱)对核苷、磷酸核苷、二磷酸核苷及三磷酸核苷化合物的分离效果, 流动相选择有机相为乙腈, 水相为乙酸铵溶液, 见表 3。考察结果表明, 在不同流动相比例及不同水相浓度条件下, XB-NH₂ 柱和 BEH HILIC 柱对大多数待测化合物均不保留。HILIC-Z 柱在乙腈比例较高且乙酸铵溶液浓度较低条件下, 对 16 个核苷(酸)化合物均有保留, 但分离效果较差。HILIC Silica 柱在乙腈-乙酸铵溶液(60 : 40)条件下对大部分待测化合物有较好的保留与分离效果, 但仍有部分难以有效分离。

之后考察了特殊键合的 C₁₈ 柱(T3 柱), 该类色谱柱可在反相条件下对强极性化合物有较好的保留。本研究考察了 Atlantis T3 柱在不同浓度、pH 的乙酸铵流动相对 16 种目标化合物的分离效果, 结果显示, 在 10 mmol·L⁻¹ 乙酸铵流动相对较好的分离, 即在运行时间为 50 min 的色谱图中有 14 个峰可见。然而, 它在较高浓度的乙酸铵(≥ 40 mmol·L⁻¹)流动相中显示不理想的分析物的色谱行为。此外, 随着流动相中乙腈含量的增加, 虽可有效地缩短运行时间, 但会导致更差的分离效果。

最后本研究采用 ODS-AQ 柱考察了传统的反相离子对色谱方法, 结果发现水相-有机相的比例、缓冲盐和离子对试剂的浓度对核苷(酸)化合物的色谱分离有很大影响。

本研究建立的液相色谱对 16 个核苷(酸)化合物有着极好的分离效果($R > 2.0$)。此外, 完成了对 4 种类型的 16 个核苷(酸)化合物的质谱裂解规律的总结和归纳, 有利于对核苷(酸)(类)药物中未知杂质的鉴定研究提供有用的质谱信息。

REFERENCES

- [1] MATEOS-VIVAS M, RODRÍGUEZ-GONZALO E, GARCÍA-GÓMEZ D, et al. Hydrophilic interaction chromatography coupled to tandem mass spectrometry in the presence of hydrophilic ion-pairing reagents for the separation of nucleosides and nucleotide mono-, di- and triphosphates[J]. *J Chromatogr A*, 2015(1414): 129-137.
- [2] RANOGAJEC A, BELUHAN S, SMIT Z. Analysis of nucleosides and monophosphate nucleotides from mushrooms with reversed-phase HPLC[J]. *J Sep Sci*, 2010, 33(8): 1024-1033.
- [3] ROBAK T, KORYCKA A, LECH-MARANDA E, et al. Current status of older and new purine nucleoside analogues in the treatment of lymphoproliferative diseases[J]. *Molecules*, 2009, 14(3): 1183-1226.
- [4] WANG L, ALBRECHT M A, WURTMAN R J. Dietary supplementation with uridine-5'-monophosphate (UMP), a membrane phosphatide precursor, increases acetylcholine level and release in striatum of aged rat[J]. *Brain Res*, 2007, 1133(1): 42-48.
- [5] YANG J N, WANG Y, GARCIA-ROVES P M, et al. Adenosine A(3) receptors regulate heart rate, motor activity and body temperature[J]. *Acta Physiol (Oxf)*, 2010, 199(2): 221-230.
- [6] WANG J S, WANG M X, HUANG Y C. Acute liver failure resulting from discontinuation of nucleoside analogues in chronic hepatitis B patients: A report of two cases[J]. *Scand J Infect Dis*, 2013, 45(2): 158-160.
- [7] CHEN P, LI W, LI Q, et al. Identification and quantification of nucleosides and nucleobases in geosaurus and leech by hydrophilic-interaction chromatography[J]. *Talanta*, 2011, 85(3): 1634-1641.
- [8] ALPERT A J. Hydrophilic-interaction chromatography for the separation of peptides, nucleic acids and other polar compounds[J]. *J Chromatogr*, 1990(499): 177-196.
- [9] GARCÍA-GÓMEZ D, RODRÍGUEZ-GONZALO E, CARABIAS-MARTÍNEZ R. Stationary phases for separation of nucleosides and nucleotides by hydrophilic interaction liquid chromatography[J]. *Trac Trends Anal Chem*, 2013(47): 111-128.
- [10] GUO Y, GAIKI S. Retention behavior of small polar compounds on polar stationary phases in hydrophilic interaction chromatography[J]. *J Chromatogr A*, 2005, 1074(1/2): 71-80.
- [11] RODRÍGUEZ-GONZALO E, GARCÍA-GÓMEZ D, CARABIAS-MARTÍNEZ R. Study of retention behaviour and mass spectrometry compatibility in zwitterionic hydrophilic interaction chromatography for the separation of modified nucleosides and nucleobases[J]. *J Chromatogr A*, 2011, 1218(26): 3994-4001.
- [12] LIANG T, FU Q, SHEN A J, et al. Preparation and chromatographic evaluation of a newly designed steviol glycoside modified-silica stationary phase in hydrophilic interaction liquid chromatography and reversed phase liquid chromatography[J]. *J Chromatogr A*, 2015(1388): 110-118.
- [13] QIAO L Z, LV W J, CHANG M M, et al. Surface-bonded amide-functionalized imidazolium ionic liquid as stationary phase for hydrophilic interaction liquid chromatography[J]. *J Chromatogr A*, 2018(1559): 141-148.
- [14] LAI G F, CHENG B, LU J. Determination of chemical components illegally mixed in antirheumatic traditional Chinese medicine by LC-MS[J]. *China Pharm(中国药师)*, 2010, 13(4): 453-455.
- [15] SONG X X, BAI Y T, XIU R, et al. Determination of theophylline residues in racehorse serum and urine by liquid-mass-isotope internal standard method[J]. *Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药理学)*, 2021(11): 1332-1338.
- [16] STUDZIŃSKA S, BUSZEWSKI B. Effect of mobile phase pH on the retention of nucleotides on different stationary phases for high-performance liquid chromatography[J]. *Anal Bioanal Chem*, 2013, 405(5): 1663-1672.

收稿日期: 2021-09-18
(本文责编: 陈怡心)