

## 适用于质谱分析的在线固相萃取除盐方法

陈 静<sup>1,2</sup>, 刘召金<sup>3</sup>, 戴振宇<sup>2</sup>, 安保超<sup>2</sup>, 许 群<sup>2\*</sup>, 张祥民<sup>1</sup>

(1. 复旦大学化学系, 上海 200433; 2. 赛默飞世尔科技中国有限公司, 上海 201203;

3. 山东省邹城市食品质量检验中心, 山东 邹城 273500)

**摘要:** 建立了一个简单、快速、有效的适用于质谱或液相色谱-质谱联用的在线固相萃取(SPE)高通量除盐方法。方法分为单柱和双柱模式,借助于包含双梯度泵(上样泵/分析泵)、自动进样器和配有十通切换阀的柱温箱的高效液相色谱系统,完成样品的自动化在线除盐。单柱模式通过上样泵实现在 SPE 柱上进样和除盐,被分析物则保留在 SPE 柱上;除盐完成后,通过阀切换利用分析泵洗脱富集在 SPE 柱上的被分析物。双柱模式则在单柱模式基础上增加了 1 根 SPE 柱,在色谱管理软件控制下 2 根 SPE 柱轮流工作,高效率完成样品的在线除盐。该方法在结合质谱分析蛋白质、多肽等领域具有较好的应用前景。

**关键词:** 固相萃取;除盐;双梯度高效液相色谱系统;阀切换;在线

中图分类号:O658

文献标识码:A

文章编号:1000-8713(2013)09-0894-04

## On-line solid phase extraction for desalting coupled with mass spectrometric analysis

CHEN Jing<sup>1,2</sup>, LIU Zhaojin<sup>3</sup>, DAI Zhenyu<sup>2</sup>, AN Baochao<sup>2</sup>, XU Qun<sup>2\*</sup>, ZHANG Xiangmin<sup>1</sup>

(1. Department of Chemistry, Fudan University, Shanghai 200433, China;

2. ThermoFisher Scientific China, Shanghai 201203, China;

3. Zoucheng Food Quality Inspection Center of Shandong Province, Zoucheng 273500, China)

**Abstract:** The work shown here describes a simple, fast and effective on-line solid phase extraction (on-line SPE) method for facilitative high-throughput sample desalting before the detection of mass spectrometry(MS) or liquid chromatography-mass spectrometry(LC-MS). This method includes single SPE column mode and dual SPE column mode. It accomplishes the on-line desalting with an Ultimate 3000 HPLC system equipped with a dual pump system (loading pump/analytical pump), an autosampler, a column oven equipped with a 2p-10p valve, controlled by a chromatography data system. In the single SPE column mode, sample loading and desalting were performed on the SPE column using the loading pump. The analytes were retained on the SPE column, and the salt in the sample solution was flushed out of the SPE column. After desalting, the retained analytes were eluted from the SPE column with the analytical pump. In the dual SPE column mode, two same SPE columns were used. Firstly, the sample loading and desalting were performed on the SPE column 1. The analytes were retained and the salt was flushed out. After desalting on the SPE column 1, the sample loading and desalting were performed on the SPE column 2. Meanwhile, the retained analytes were eluted from the SPE column 1 with the analytical pump. As both of the processes on the SPE columns 1 and 2 described above completed, the sample loading and desalting on the SPE column 1, and the elution of the analytes from the SPE column 2 started again. As the SPE columns 1 and 2 worked in turn, the on-line SPE desalting system was efficient. The eluted analytes from the SPE columns may be determined by MS directly, or separated on the analytical column and then determined by MS/UV.

**Key words:** solid phase extraction (SPE); desalt; dual-gradient high performance liquid chroma-

\* 通讯联系人, E-mail: qun.xu@thermofisher.com.

基金项目: 国家自然科学基金项目(21175026).

收稿日期: 2013-01-30

tography (HPLC); valve-switching; on-line

质谱(MS)和液相色谱-质谱联用(LC-MS)技术已经成为分析复杂生化样品的有效手段。但生化样品如多肽和蛋白质的制备过程中所大量使用的高浓度盐会干扰质谱分析的离子化过程,从而导致分析物峰强度降低和离子源污染,致使检测无法进行。因此,质谱检测前对样品的除盐显得尤为重要。目前常用的除盐方法主要是固相萃取技术(SPE),即蛋白质或多肽保留在吸附材料上,盐类不吸附而被除去,然后将保留的蛋白质或多肽洗脱下来进行检测。常用的吸附材料有反相固定相、高分子聚合物、石墨化碳、纳米材料等。将这些材料填充或者整体聚合在小柱或微柱中,用于蛋白质或多肽的除盐与富集<sup>[1]</sup>。常见的 SPE 有离线(off-line)和在线(on-line)技术。与前者相比,后者具有自动化程度高、节约时间和方法重现性好等优点,其相关技术的开发和应用日益受到重视<sup>[2-6]</sup>。

本文建立了一种简单、快速和有效的在线固相萃取方法,可用于质谱和液相色谱-质谱联用分析生化样品的高通量除盐。方法分为单柱和双柱两种模式,借助于包含双梯度泵、自动进样器和配有 2 位十通切换阀的柱温箱的高效液相色谱(HPLC)系统,在色谱管理软件的控制下,完成样品的在线除盐,实现了除盐自动化。以磷酸缓冲盐质量浓度为 1.0 g/L 的寡核苷酸样品为例,在双萃取柱模式下的除盐、淋洗以及分离测定在 1.1 min 即可完成,大大提高了工作效率。

## 1 实验部分

### 1.1 仪器与试剂

Thermo UltiMate 3000 高效液相色谱仪,带有双三元梯度泵(DGP-3600A),配置六通道在线脱气机(SRD-3600)、自动进样器(WPS-3000TSL,带大体积进样组件)、柱温箱(TCC-3200RS,带 2 位十通切换阀)、二极管阵列检测器(DAD-3400RS);变色龙色谱管理软件(Chromeleon® 6.8 SR9),美国赛默飞世尔公司。

乙腈(色谱纯),去离子水(18.2 MΩ·cm),碳酸氢铵、甲酸、溴化钾均为分析纯。

### 1.2 样品

含高浓度磷酸缓冲盐的寡核苷酸样品由江苏某生化制品公司提供;经过纯化和除盐的牛血清蛋白(BSA)标准品由上海阿敏生物技术有限公司提供。

### 1.3 在线固相萃取除盐单萃取柱模式的流程

以对含有 4 g/L KBr 的 BSA 标准品溶液进行除盐为例,描述本研究中的在线串联固相萃取除盐单萃取柱模式的流程(见图 1)。十通阀 1—10 位通时,上样泵以 0.1% (如无特殊说明均为体积分数) HCOOH 溶液为流动相,1.5 mL/min 流速进样。样品溶液中的 BSA 被保留在 SPE 柱(Acclaim PA II Guard, 10 mm×4.3 mm, 5 μm)上,而 KBr 不保留,被淋洗出 SPE 柱。在 SPE 柱上完成除盐后,通过阀切换使 1—2 位通,分析泵以 0.1% HCOOH 溶液-乙腈(6:4, v/v)为流动相,1 mL/min 流速淋洗 SPE 柱,将富集的 BSA 洗脱。通过流路①与 MS 直接连接进行分析(on-line SPE-MS),或与紫外(UV)检测器连接直接进行在线固相萃取-流动注射(on-line SPE-flow injection)分析;或通过流路②经过色谱柱(Acclaim PA II, 33 mm×3.0 mm, 3 μm)分离后进入 MS 进行分析(on-line SPE-LC-MS),或使用紫外检测器进行分析(on-line SPE-HPLC)。

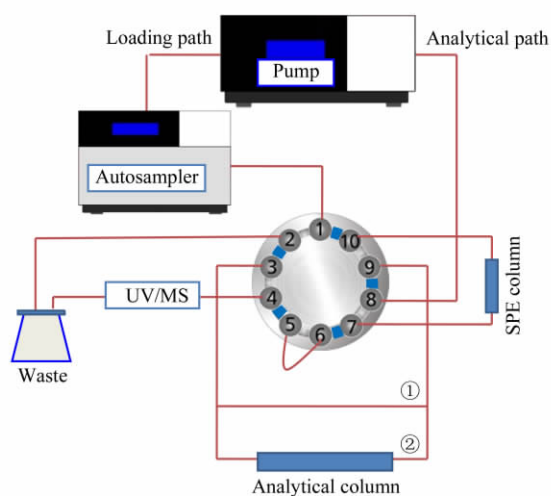


图 1 在线固相萃取除盐单萃取柱模式的流程图  
Fig. 1 Schematic diagram of the on-line SPE desalting system of single SPE column mode

### 1.4 在线固相萃取除盐双萃取柱模式的流程

同样,以对含有 4 g/L KBr 的 BSA 标准品溶液进行除盐为例,描述本研究中的在线固相萃取除盐双萃取柱模式的流程(见图 2)。上样泵和分析泵所用的流动相、色谱柱以及萃取和淋洗条件均与单柱模式相同。十通阀 1—2 位通时,在 SPE 柱 1 上进样和除盐(周期 1)。上样泵进样后,样品溶液中的 BSA 被保留在 SPE 柱 1 上,而 KBr 不保留,被淋洗出 SPE 柱。当周期 1 完成,将十通阀切换至 1—10 位通,周期 2(在 SPE 柱 2 上进样和除盐)开始,其使

用的 SPE 柱和条件均与周期 1 相同。与此同时,分析泵将富集的 BSA 洗脱,通过流路①与 MS 或与紫外检测器直接连接进行分析;或通过流路②经过色谱柱(Acclaim 300 C18, 50 mm×4.6 mm, 3  $\mu$ m)分离后进入 MS 或紫外检测器进行分析。当周期 2 完成,将十通阀切换回至 1—2 位通,周期 1 又开始运转;同时,富集在 SPE 柱 2 上的 BSA 则被洗脱、检测或经过分离后检测。这样,SPE 柱 1 和 2 轮流工作,高效率地完成样品的在线除盐及检测。

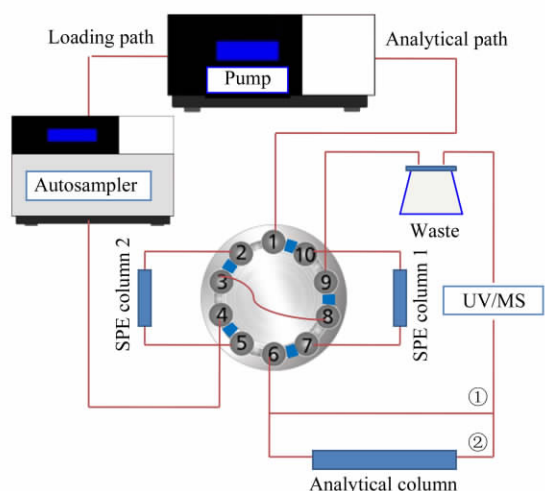


图 2 在线固相萃取除盐双萃取柱模式的流程图

Fig. 2 Schematic diagram of the on-line SPE desalting system of dual SPE column mode

## 2 结果与讨论

### 2.1 除盐效果的评价

提高在线固相萃取除盐效果的方法一般有两种,一是延长除盐时间,也就是延长切阀时间;二是增大除盐的流速。由于生化样品制备时通常所使用

的缓冲盐溶液如磷酸盐溶液没有紫外吸收,在方法开发时可以通过向样品溶液中加入有紫外吸收的盐如 KBr 来判断除盐效果。

图 3 是单萃取柱模式下,不同质量浓度 KBr 溶液进行在线固相萃取-流动注射分析的色谱图。可以观察到,0.5 min 时 2.0 和 4.0 g/L 的 KBr 溶液尚有残余,但 1.5 min 时 4.0 g/L 的 KBr 溶液也已经完全除去,表明延长固相萃取除盐时间,在线固相萃取除盐效果得到提高。

图 4 是单萃取柱模式下不同除盐流速时,含有 2.0 g/L KBr 的寡核苷酸样品的在线固相萃取-高效液相色谱图。如图 4a 所示,除盐流速为 1.0

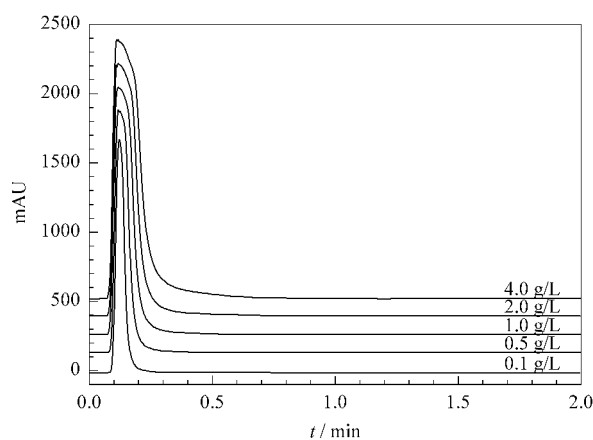


图 3 在线固相萃取除盐单萃取柱模式下不同质量浓度 KBr 溶液的流动注射分析色谱图

Fig. 3 Chromatograms of on-line SPE-flow injection analysis of KBr solutions with different mass concentrations using the on-line SPE desalting single SPE column mode

SPE column, Acclaim PA II Guard (10 mm×4.3 mm, 5  $\mu$ m); mobile phase, 5 mmol/L  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ ; temperature, 30  $^\circ\text{C}$ ; flow rate, 1.0 mL/min for desalting; injection volume, 5  $\mu\text{L}$ ; detection, UV at 215 nm.

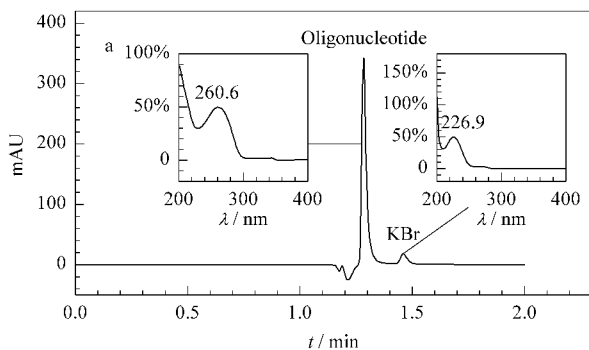


图 4 在线固相萃取除盐单萃取柱模式下的含有 2.0 g/L KBr 的寡核苷酸样品在除盐流速为(a)1.0 mL/min 和 (b)2.0 mL/min 时的高效液相色谱图

Fig. 4 Chromatograms of on-line SPE-HPLC analysis of an oligonucleotide sample spiked with 2.0 g/L KBr and desalted at the flow rates of (a) 1.0 mL/min and (b) 2.0 mL/min using the on-line SPE desalting single SPE column mode

Conditions for separation: analytical column, Acclaim PA II (33 mm×3.0 mm, 3  $\mu$ m); mobile phase, 5 mmol/L  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ - $\text{CH}_3\text{CN}$  (8 : 2, v/v); flow rate, 1.5 mL/min; detection, UV at 254 nm; temperature, 30  $^\circ\text{C}$ . Valve switching time, 1.0 min. Conditions for desalting were the same as in Fig. 3.

mL/min 时寡核苷酸色谱峰后有一个小色谱峰。经过紫外吸收光谱比对可确认该峰是残留的 KBr,说明样品中的盐没有完全去除。而如图 4b 所示,当除盐流速增大至 2.0 mL/min 时该色谱峰消失,表明样品中的盐已经去除。因此,通过增大固相萃取除盐的流速,可以提高在线固相萃取除盐效果。

## 2.2 在线固相萃取除盐方法的重现性

通过计算双萃取柱模式下连续进样 10 次含有 4.0 g/L KBr 的 BSA 溶液(每个萃取柱上各 5 次),所得到的 BSA 色谱峰(见图 5)的保留时间和峰面积的 RSD 来评估在线固相萃取除盐方法的重现性。BSA 保留时间的 RSD 为 0.1%,峰面积的 RSD 为 1.0%,说明该方法的重现性良好。

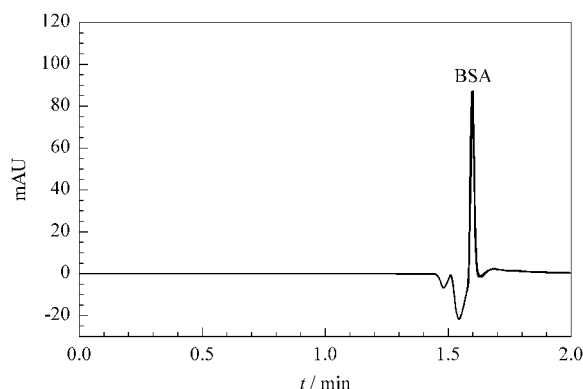


图 5 在线固相萃取除盐双萃取柱模式下连续进样 10 次含有 4.0 g/L KBr 的 BSA 溶液(每个萃取柱上各 5 次)的高效液相色谱图

Fig. 5 Chromatograms of 10 consecutive injections (5 injections for each SPE column) on on-line SPE-HPLC of BSA spiked with 4.0 g/L KBr using the on-line SPE desalting dual SPE column mode

Conditions for desalting: SPE columns, two Acclaim PA II Guard (10 mm×4.3 mm, 5 μm); mobile phase, 0.1% HCOOH; flow rate, 1.5 mL/min; injection volume, 5 μL; temperature, 30 °C. Conditions for separation: analytical column, Acclaim 300 C18 (50 mm×4.6 mm, 3 μm); mobile phase, 0.1% HCOOH-CH<sub>3</sub>CN (6:4, v/v); flow rate, 1.0 mL/min; detection, UV at 280 nm; temperature, 30 °C. Valve switching time, 1.0 min.

当样品溶液中的盐浓度不高时,采取双萃取柱模式,通过适当缩短阀切换时间可以大大提高在线固相萃取除盐的效率;但频繁的阀切换可能会导致方法重现性的降低。因此,机械性能良好的双梯度泵是实现这一目的的保证。图 6 是磷酸缓冲盐质量浓度低于 1.0 g/L 的寡核苷酸样品在双萃取柱模式下的液相色谱图,阀切换时间缩短至 0.4 min,连续进样 8 次(每个萃取柱上各 4 次)。除盐、淋洗和分离测定在 1.1 min 即可完成。寡核苷酸保留时间的 RSD 为 0,峰面积的 RSD 为 1.5%。

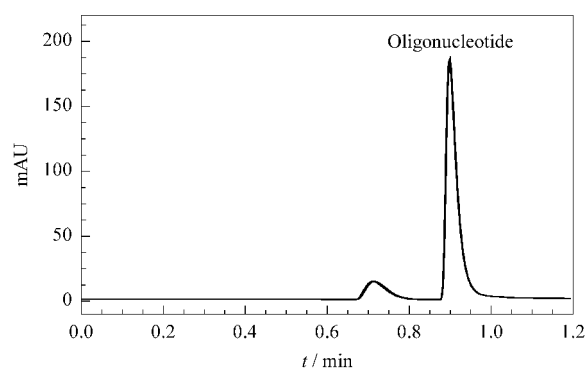


图 6 在线固相萃取除盐双萃取柱模式下连续进样 8 次寡核苷酸样品(每个萃取柱上各 4 次)的高效液相色谱图

Fig. 6 Chromatograms of 8 consecutive injections (4 injections for each SPE column) on on-line SPE-HPLC of the oligonucleotide sample using the on-line SPE desalting dual SPE column mode

Conditions for desalting: SPE columns, two Acclaim PA II Guard (10 mm×4.3 mm, 5 μm); mobile phase, 5 mmol/L NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>; flow rate, 1.5 mL/min; injection volume, 2 μL; temperature, 30 °C. Conditions for separation: analytical column, Acclaim PA II (33 mm×3.0 mm, 3 μm); mobile phase, 5 mmol/L NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>-CH<sub>3</sub>CN (8:2, v/v); flow rate, 0.8 mL/min; detection, UV at 254 nm; temperature, 30 °C. Valve switching time, 0.4 min.

## 3 结语

本文建立了简单、快速和有效的适用于与质谱和液相色谱-质谱联用的生化样品在线高通量固相萃取除盐方法。方法分为单柱和双柱两种模式,样品除盐过程完全由液相色谱系统自动完成。与传统除盐方法相比,该方法具有样品需求量少、试剂消耗量少、操作简单、分析成本低廉、除盐效率高等特点,大大提高了工作效率。因此,该技术在生化样品的分析中有很好的应用前景。

致谢 本文的完成得到了李浪和罗继两位同仁的倾力协助,作者在此表示衷心感谢!

## 参考文献:

- [1] Cook K, Thayer J. Bioanalysis, 2011, 3(10): 1109
- [2] Sun L L, Duan J C, Tao D Y, et al. Rapid Commun Mass Spectrom, 2008, 22(15): 2391
- [3] Fountain K J, Gilar M, Gebler J C. Rapid Commun Mass Spectrom, 2004, 18(12): 1295
- [4] Yoshida H, Mizukoshi T, Hirayama K, et al. J Chromatogr A, 2006, 1119(1/2): 315
- [5] Thayer J R, Puri N, Burnett C, et al. Anal Biochem, 2010, 399(1): 110
- [6] Liu J, Pan Y H, Xu Q, et al. Scientia Agricultura Sinica (刘静, 潘映红, 徐琴, 等. 中国农业科学), 2009, 42(3): 772