

## ACQUITY QDa质谱检测器在合成寡核苷酸分析中的应用

---

Robert E. Birdsall, Ying Qing Yu

Waters Corporation

---

### 摘要

在本应用纪要中，我们证明ACQUITY QDa质谱检测器可提供一种简单且经济有效的寡核苷酸检测解决方案，分子量覆盖范围宽，并能轻松集成到现有基于UV的工作流程中。

### 优势

- 使用配有MaxEnt去卷积算法的MassLynx在合成寡核苷酸分析中增加质谱数据
- 使用传统IP-RPLC流动相补充质量数信息
- 采用在线正交检测技术提高分析效率

### 简介

Waters ACQUITY QDa质谱检测器是一款经济有效的工具，可在生物制药生产环境中用作正交检测技术，为现有基于光学检测的LC工作流程增加获取质谱数据的功能<sup>1-3</sup>。由于脱氧核糖核酸(DNA)正/反义寡核苷酸和干扰性核糖核酸(iRNA)疗法的潜在应用前景，治疗性寡核苷酸的研究受到了制药行业越来越多的关注<sup>4-5</sup>。IP-RPLC已成为分

---

析合成寡核苷酸的一种常用技术，部分原因是此类技术具有良好的选择性，并且能够与兼容MS的试剂和缓冲液结合使用（由Apffel及其同事首次证明）<sup>6-7</sup>。MS检测提供的质量数信息可用于有效识别复杂的碱基修饰，进而提高合成治疗性寡核苷酸分析工作流程的效率。本研究自然延伸为评估ACQUITY QDa产品作为正交检测技术在合成寡核苷酸分析中的适用性。

本应用纪要的目的是，证明ACQUITY QDa质谱检测器可提供一种简单且经济有效的寡核苷酸检测解决方案，分子量覆盖范围宽，并能轻松集成到现有基于UV的工作流程中。本研究中使用了一组长度为15 nt~35 nt的polyT标准品，评估ACQUITY QDa质谱检测器在寡核苷酸分析中的准确度和兼容性，实验使用由三乙胺(TEA)和1,1,1,3,3,3-六氟-2-丙醇(HFIP)组成的传统IP-RPLC流动相。

---

## 实验

三乙胺（纯度99.5%）和1,1,1,3,3,3-六氟-2-丙醇（纯度99.8%，LC-MS级）购自Sigma Aldrich。LC-UV级溶剂（Optima系列）购自Fisher Scientific。流动相缓冲液在实验开始前现配。PolyT寡核苷酸标准品购自沃特世，制成浓度为10 pmol/uL的溶液。柱上载样量保持50 pmol或进样体积5  $\mu$ L不变。

## 液相色谱条件

液相色谱系统:	ACQUITY UPLC H-Class
检测器:	配备钛流通池的ACQUITY UPLC TUV, ACQUITY QDa质谱检测器
吸收波长:	260 nm
色谱柱:	ACQUITY UPLC BEH C <sub>18</sub> 寡核苷酸分析专用柱, 130Å, 1.7 $\mu$ m, 2.1 mm x 50 mm
柱温:	60 °C
样品温度:	10 °C

进样体积： 5  $\mu$ L

流动相A： 15 mM TEA, 400 mM HFIP水溶液, pH 8.0

流动相B： 15 mM TEA, 400 mM HFIP的甲醇溶液

\*流动相使用重量法配制

## 梯度：

时间	流速( mL/min)	%A	%B	%C	%D
初始	0.200	81.0	19.0	0	0
15.00	0.200	73.5	26.5	0	0
16.00	0.200	50.0	50.0	0	0
17.00	0.200	81.0	19.0	0	0
21.00	0.200	81.0	19.0	0	0

## QDa质谱检测器设置

采样速率： 2点/秒

质量范围： 410-1,250 Da

模式： 负离子

采集模式： 连续

锥孔电压：	20 V
毛细管电压：	0.8 kV
探头温度：	600 °C

## 数据管理

带有MaxEnt1的MassLynx SCN 9.25

---

## 结果与讨论

IP-RPLC已成为分析寡核苷酸的一种常用技术，部分原因是此类方法的分离效率比其他基于电荷的替代分离方法更高<sup>5</sup>。Apffel及其同事首次证明，使用TEA/HFIP等兼容MS的缓冲液，可根据正交质谱数据有效识别寡核苷酸中复杂的碱基修饰<sup>6-7</sup>。为证明ACQUITY QDa与此类IP-RPLC方法兼容，我们使用TEA/HFIP缓冲液对五个长度递增的polyT标准品进行了分离实验。如图1所示，光学色谱图(TUV)与质谱检测器（QDa，串联配置在光学检测器后面）的响应表现出高度相关性。从这些数据可以明显看出，ACQUITY QDa质谱检测器能够使用传统IP-RPLC方法提供质谱数据，该方法会用到离子对试剂，例如用HFIP缓冲的TEA。如图1所示，ACQUITY QDa质谱检测器的强度谱图与UV谱图相似，但不完全相同。我们通过解析原始MS谱图深入了解了强度谱图的差异。

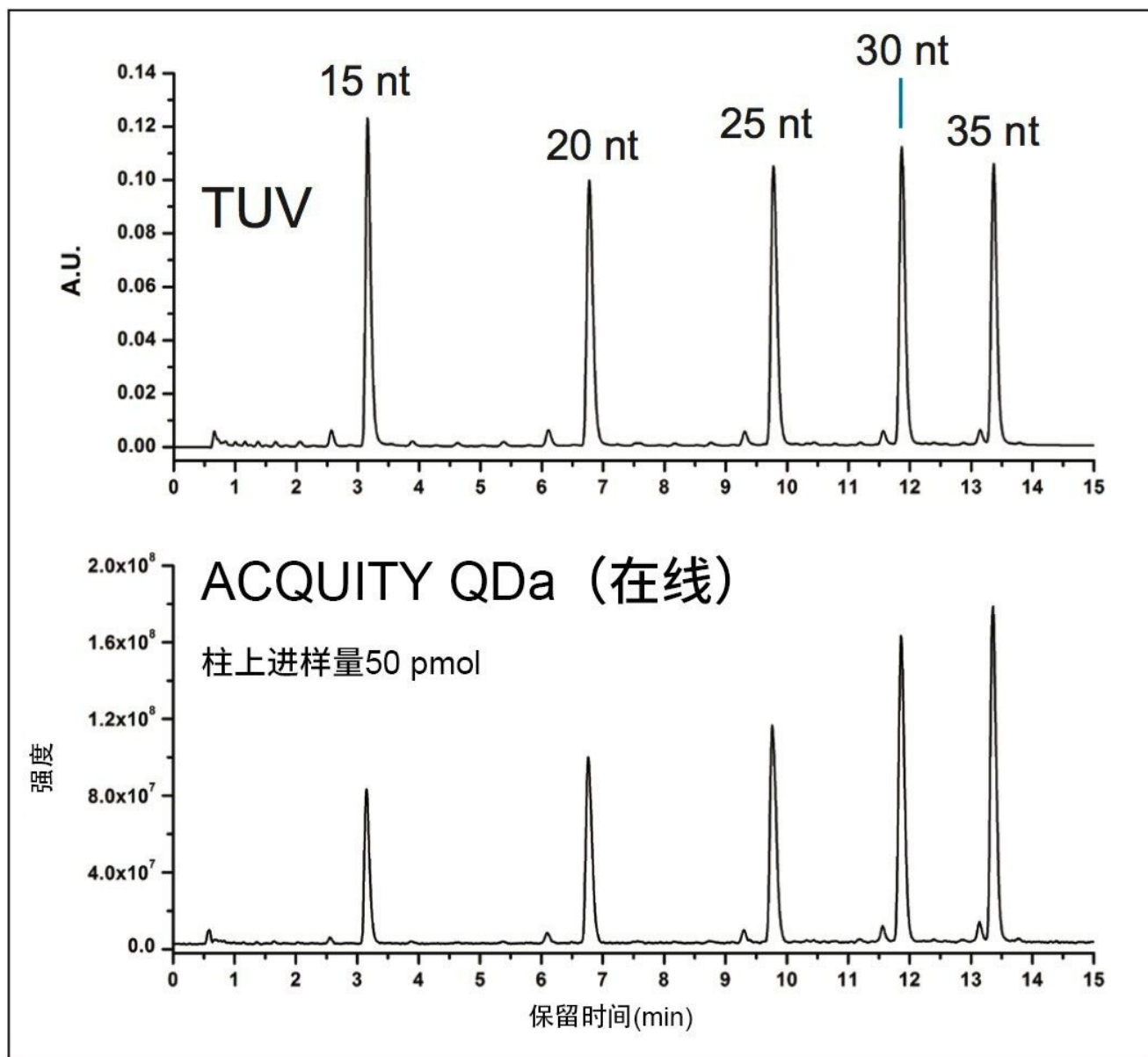


图1.使用QDa分析寡核苷酸。将ACQUITY QDa串联配置在UV检测后面，对五个polyT标准品进行IP-RPLC分离。

表1显示，每个寡核苷酸标准品都能观察到多个电荷态（用绿色高亮）。仔细检查35 nt标准品至少可以观察到九种电荷态。强度差异较大的较短序列观察到的电荷态较少，这表明可能存在更低的电荷态没有观察到，因为它们超出了检测器扫描范围(>1250  $m/z$ )。这种现象并不影响治疗性寡核苷酸的质谱数据，因为即使是最短的标准品(nt 15)也能观察到五种电荷态。

## 绿色 = 观察到的电荷态

nt	平均分子量	[M-4H] <sup>4</sup>	[M-5H] <sup>5</sup>	[M-6H] <sup>6</sup>	[M-7H] <sup>7</sup>	[M-8H] <sup>8</sup>	[M-9H] <sup>9</sup>	[M-10H] <sup>10</sup>	[M-11H] <sup>11</sup>	[M-12H] <sup>12</sup>	[M-13H] <sup>13</sup>	[M-14H] <sup>14</sup>	[M-15H] <sup>15</sup>	[M-16H] <sup>16</sup>	[M-17H] <sup>17</sup>
15	4,500.9	1124.2	899.2	749.1	642.0	561.6	499.1	449.1	408.2	374.1	345.2	320.5	299.1	280.3	263.8
20	6,021.9	1504.5	1203.4	1002.6	859.3	751.7	668.1	601.2	546.4	500.8	462.2	429.1	400.5	375.4	353.2
25	7,542.9	1884.7	1507.6	1256.1	1076.5	941.9	837.1	753.3	684.7	627.6	579.2	537.8	501.9	470.4	442.7
30	9,063.8	2265.0	1811.8	1509.6	1293.8	1132.0	1006.1	905.4	823.0	754.3	696.2	646.4	603.2	565.5	532.2
35	10,584.8	2645.2	2116.0	1763.1	1511.1	1322.1	1175.1	1057.5	961.2	881.1	813.2	755.0	704.6	660.5	621.6

表1.寡核苷酸 $m/z$ 表。使用基于 $polyT$ 标准品平均分子量的电荷态表来识别通过ACQUITY QDa检测观察到的电荷态。绿色高亮部分表示在每个标准品中观察到的电荷态。

如表1所示，在 $polyT$ 标准品中观察到多个不同的电荷态，由此引发了仪器准确度问题。对此，我们使用在寡核苷酸标准品中观察到的电荷态评估了ACQUITY QDa质谱检测器的电荷态准确度。在该评估中，我们使用每个寡核苷酸的平均分子量来确定电荷态 $m/z$ 观测值与理论值之间的差异。表2中列出了30 nt标准品三个技术重复样的结果，作为代表性样品。从表2可以看出，观测电荷态的衍生质量数在仪器标准 $\pm 0.2$  Da以内，每个电荷态的RSD不高于0.02%，证明了该方法具有较高的重复性。其余标准品的观测电荷态获得类似结果（数据未显示），证明ACQUITY QDa能够为寡核苷酸分析提供精确质量数信息。

30 nt, N=3	[M-8H] <sup>8</sup>	[M-9H] <sup>9</sup>	[M-10H] <sup>10</sup>	[M-11H] <sup>11</sup>	[M-12H] <sup>12</sup>	[M-13H] <sup>13</sup>	[M-14H] <sup>14</sup>	[M-15H] <sup>15</sup>
预期值	1132.0	1006.1	905.4	823.0	754.3	696.2	646.4	603.2
实测值	1132.1	1006.1	905.4	823.1	754.3	696.2	646.5	603.4
标准偏差	0.07	0.12	0.04	0.00	0.04	0.04	0.14	0.08
% R.S.D.	0.01	0.01	0.00	0.00	0.01	0.01	0.02	0.01

表2. $m/z$ 准确度评估。比较基于30 nt标准品平均分子量的预期电荷态与观测电荷态，质量精度在仪器标准 $\pm 0.2$  Da范围内。

如图2A所示，在寡核苷酸中观察到的电荷态数量越多，质谱图越无法直接解析。治疗性寡核苷酸的分析非常需要一种能够高效提供精确质量数信息的工作流程。为此，可以采用MaxEnt1等去卷积算法来提供寡核苷酸谱图的质谱数据，提高分析效率。为评估该功能，我们以30 nt标准品的峰顶点为中心，设置一个一分钟的窗口，与QDa获得的MS谱图数据组合。去卷积的峰宽约为0.7 Da，合并分辨率为0.5 Da。如图2B所示，将30 nt标准品的谱图去卷积至零电荷态质量数9064.5 Da，该质量数与预期平均分子量的偏差在0.7 Da以内。还观察到少量钠( $Na^+$ )加合物，相对强度为6%。LC分离中经常会遇到微量盐，因为它们对寡核苷酸的磷酸二酯骨架具有很高的亲和力。与电荷态评估类似，我们对整组标准品评估了去卷积算法的质量精度。

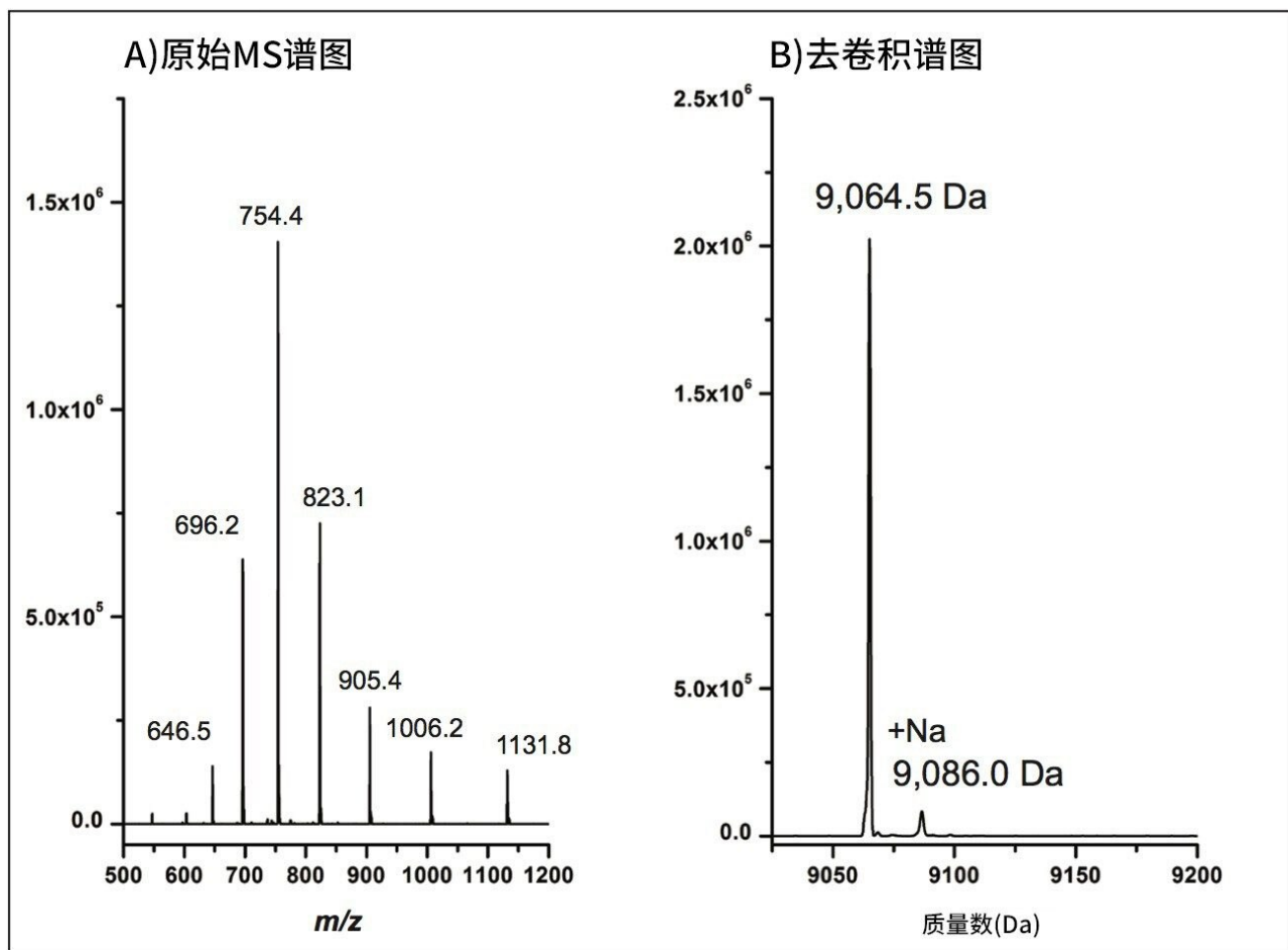


图2. MS谱图的MaxEnt1去卷积处理。A)使用ACQUITY QDa连续采集数据时, 30 nt标准品的原始谱图中有多个电荷态。B)对30 nt标准品的原始MS谱图进行去卷积处理后, 得到一个质量数为9064.5 Da (+0.7 Da)的母峰和一个钠( $\text{Na}^+$ )加合物小峰 (相对强度小于6%)。

使用与之前相同的方法, 根据每个寡核苷酸的平均分子量来确定去卷积质量数观测值和理论值之间的差异。使用相同的扫描数和 $m/z$ 范围来组合polyT标准品的MS谱图。标准品的去卷积参数保持不变, 结果见表3。如表3所示, 三个技术重复样的去卷积结果高度可重现, 未在去卷积质量数中观察到偏差。各polyT标准品的质量精度范围为+0.0 Da~+0.7 Da, 序列越长, 偏差越大。这一点并非完全出乎意料, 因为仪器误差会随着电荷态升高而增加。鉴于此, 15-35 nt范围内寡核苷酸的质量精度为 $\pm 1.0$  Da, 证明ACQUITY QDa能够有效提供足够的质量数信息, 用于合成寡核苷酸生产过程中的常规鉴定和纯度评估。

N=3	nt 15	nt 20	nt 25	nt 30	nt 35
预期值	4500.9	6021.9	7542.9	9063.8	10584.8
试验1	4500.9	6022.5	7543.5	9064.5	10585.5
试验2	4500.9	6022.5	7543.5	9064.5	10585.5
试验3	4500.9	6022.5	7543.5	9064.5	10585.5
平均值	4500.9	6022.5	7543.5	9064.5	10585.5
$\Delta$ 质量数(Da)	0.0	0.6	0.6	0.7	0.7

表3. MaxEnt1去卷积质量数的质量精度评估。比较基于polyT标准品平均分子量的预期质量数与平均去卷积质量数。整组标准品的质量精度范围为+0.0 Da~+0.7 Da。

## 结论

制药行业迫切需要既能带来附加价值，又能以最少的精力投入应用到现有工作流程中，而且还具有经济效益的技术。ACQUITY QDa质谱检测器在单一工作流程中提供的补充质量数信息可帮助分析人员有效提高常规分析的效率。本研究自然延伸为评估ACQUITY QDa产品在生物药物分析中的适用性，而不仅限于mAb。研究表明，ACQUITY QDa与IP-RPLC流动相兼容，并且能够检测和准确报告较宽分子量范围内的寡核苷酸质量数信息。总的来说，这些结果证明ACQUITY QDa是分析实验室的理想补充技术，可以在合成寡核苷酸的生产过程中提高常规鉴定和纯度评估的效率和数据分析可信度。

## 参考资料

1. Birdsall, R., McCarthy S. Increasing Specificity and Sensitivity in Routine Peptide Analyses Using Mass Detection with the ACQUITY QDa Detector.2015; 720005377en.
2. Cosgrave, E., Birdsall R., McCarthy S. 在工艺开发阶段利用Rapi Fluor-MS和ACQUITY QDa质谱检测器快速监测游离N-糖谱图.2015; 720005438ZH.
3. Birdsall, R., McCarthy S. ACQUITY QDa质谱检测器在常规肽水平生物治疗药物分析中的应用.2015. 720005266ZH.



4. Agrawal S., Zhao Q. Antisense therapeutics. *Current Opinion in Chemical Biology* 1998; 2:519–28.
  5. McGinnis A.C., Chen B., Bartlett M.G. Chromatographic methods for the determination of therapeutic oligonucleotides. *Journal of Chromatography B* 2012; 883–884:76–94.
  6. Apffel A., Chakel J.A., Fischer S., Lichtenwalter K., Hancock W.S. Analysis of Oligonucleotides by HPLC – Electrospray Ionization Mass Spectrometry. *Analytical Chemistry* 1997; 69:1320–5.
  7. Apffel A., Chakel J.A., Fischer S., Lichtenwalter K., Hancock W.S. New procedure for the use of high-performance liquid chromatography–electrospray ionization mass spectrometry for the analysis of nucleotides and oligonucleotides. *Journal of Chromatography A* 1997; 777:3–21.
- 

## 特色产品

ACQUITY QDa质谱检测器 <<https://www.waters.com/134761404>>

ACQUITY UPLC H-Class PLUS系统 <<https://www.waters.com/10138533>>

ACQUITY UPLC可变波长紫外检测器 <<https://www.waters.com/514228>>

MassLynx质谱软件 <<https://www.waters.com/513164>>

## 可在线购买

MassPREP OST标准品 <<https://www.waters.com/waters/partDetail.htm?partNumber=186004135>>

ACQUITY UPLC BEH C18寡核苷酸分析专用柱, 130Å, 1.7 μm, 2.1 mm × 50 mm, 1个/包 <

<https://www.waters.com/waters/partDetail.htm?partNumber=186003949>>

720005632ZH, 2016年3月

©2019 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