

利用符合法规要求的自动化LC-MS工作流程对寡聚核苷酸进行完整质量数确认和纯度分析

Catalin E. Doneanu, Jonathan Fox, Emma Harry, Chris Knowles, Ying Qing Yu, Joseph Fredette, Weibin Chen

Waters Corporation

摘要

本应用纪要介绍以waters_connect HUB数据采集处理软件控制BioAccord系统进行寡聚核苷酸分析的精简、合规工作流程。

优势

- 利用符合法规要求的自动化LC-MS工作流程对修饰和未修饰的寡聚核苷酸进行质量数确认
- 利用LC-UV分析方法对寡聚核苷酸进行纯度分析和杂质相对定量

简介

近年来，寡聚核苷酸类药物开始作为小分子及治疗性蛋白的有力补充¹。寡聚核苷酸类药物的生产和质量控制需要

使用高选择性、高灵敏度的LC-MS方法。寡聚核苷酸的质谱分析方法通常是采用多种离子对试剂和改性剂在负离子ESI-MS模式下进行反相色谱分析。最近，寡聚核苷酸分析的集成式LC-MS工作流程已成功应用于四极杆和QTof LC-MS平台²⁻⁴。

图1展示的BioAccord系统是沃特世于2019年推出的一套紧凑、稳定且简便易用的平台，可用于生物药物常规分析。本文介绍以waters_connect HUB数据采集和处理软件控制BioAccord系统进行寡聚核苷酸分析的精简、合规工作流程。完全集成式BioAccord LC-MS系统包含一套ACQUITY UPLC I-Class PLUS系统、一台ACQUITY UPLC可变波长紫外(TUV)检测器以及电喷雾-飞行时间型ACQUITY RDa质谱检测器。本应用纪要提供的所有LC-MS数据均在全扫描MS模式下采集，并用waters_connect进行以下处理：自动质谱去卷积、完整寡聚核苷酸质量数测定结果报告以及UV法纯度分析。未修饰和修饰的寡聚核苷酸均采用本文所述工作流程进行分析。



图1. Waters BioAccord LC-MS和信息学平台

实验

试剂和样品前处理

三乙胺 (TEA, 纯度99.5%, 产品目录号65897-50ML) 和甲醇 (LC-MS级, 产品目录号34966-1L) 购自 Honeywell (卡罗来纳州夏洛特), 1,1,1,3,3,3-六氟-2-丙醇 (HFIP, 纯度99%, 产品目录号105228-100G) 购自Sigma Aldrich (密苏里州圣路易斯)。HPLC级去离子(DI)水使用MilliQ系统 (马萨诸塞州贝德福德密理博公司) 净化。流动相现配现用。将MassPREP OST (寡聚核苷酸分离技术) 标准品 (部件号: 186004135) 溶于去离子水中, 制得浓度为1 μ M、100 nM和10 nM的稀释系列溶液。25 mer全硫代磷酸化(PPT)寡聚核苷酸(5'-C*T*C*T*C* G*C*A*C*C* C*A*T*C*T* C*T*C*T*C* C*T*T*C*T*-3')购自Integrated DNA Technologies (艾奥瓦州科尔维尔), 并用去离子水稀释, 制得浓度为1 μ M的溶液。100 mer寡聚核苷酸(5'-TGCCA GTTGC AGTTG TTTCC GAGCA GAAAC TCATC TCTGA AGAGG ATCTG GAGCA GAAAC TCATC TCTGA AGAGG ATCTG CACAC GCTGG AGCTG CCGCG-3')购自Integrated DNA Technologies, 并用去离子水稀释, 制得浓度为1 μ M的溶液。所有样品的进样体积均为10 μ L。

LC-MS系统: BioAccord, 包含ACQUITY RDa质谱检测器、ACQUITY UPLC I-Class PLUS和ACQUITY UPLC TUV检测器

LC条件

OST色谱柱:	2.1 \times 50 mm, 装填1.7 μ m C ₁₈ 颗粒 (部件号: 186003949)
柱温:	60°C
流速:	300 μ L/min
流动相A:	80 mM HFIP (六氟异丙醇), 7 mM TEA (三乙胺), 溶于去离子水中
流动相B:	40 mM HFIP, 3.5 mM TEA, 溶于50%甲醇
样品温度:	6 °C
进样体积:	10 μ L
清除溶剂:	50%甲醇

样品管理器清洗溶剂:

50%甲醇

密封清洗液:

20%乙腈的去离子水溶液

梯度表:

时间 (min)	流速 ($\mu\text{L}/\text{min}$)	溶剂A 含量(%)	溶剂B 含量(%)	曲线图
0.00	300	78	22	初始
10.00	300	60	40	6
11.00	300	15	85	6
12.00	300	15	85	6
12.10	300	78	22	6
15.00	300	78	22	6
60.00	300	78	22	6
61.00	20	50	50	6

MS条件

电离模式:

ESI-

毛细管电压:

0.8 kV

锥孔电压:

40 V

离子源温度:	120 °C
脱溶剂气温度:	400 °C
脱溶剂气体(N ₂)压力:	6.5 bar
TOF质量范围:	400~5000
采集速率:	2 Hz
时时校正标准液:	waters_connect时时校正标准液 (部件号 : 186009298)
数据采集软件:	waters_connect
数据处理软件:	waters_connect

结果与讨论

如图2所示, 使用ACQUITY UPLC OST色谱柱和实验部分列出的离子对RP条件, 聚脱氧胸苷(polyT)寡聚核苷酸及其截断序列杂质在8分钟内即实现了出色分离。UV和TIC色谱图中均检出多种微量寡聚核苷酸杂质, 这有助于根据相应的负离子模式ESI-MS谱图对所有截断的寡聚核苷酸物质进行指认。OST MassPREP标准品中确认共有26种寡聚核苷酸组分, 其中5种主要组分(dT15、dT20、dT25、dT30和dT35)的ESI-MS谱图见图3A。所有谱图中的电荷态均呈双峰分布, 且每种寡聚核苷酸的低电荷态(-3~-5)和高电荷态(-7~-15)均达到了各自的最大值。这是寡聚核苷酸离子对反相分离的典型谱图特征, 能够提供广泛的质量范围($m/z = 600 \sim 3000$)以及数量相对较多的电荷态(6~12)便于去卷积。ACQUITY RDa质谱检测器的分辨率(>10,000)足以分辨高电荷态寡聚核苷酸离子的同位素, 如图3B所示, 可以看到dT35寡聚核苷酸[M-12H]⁻¹²电荷态的单同位素峰明显区分。上述对各电荷态的同位素分辨率有助于BayesSpray去卷积算法5在计算寡聚核苷酸的去卷积平均质量数时得出更加准确的测定结果。

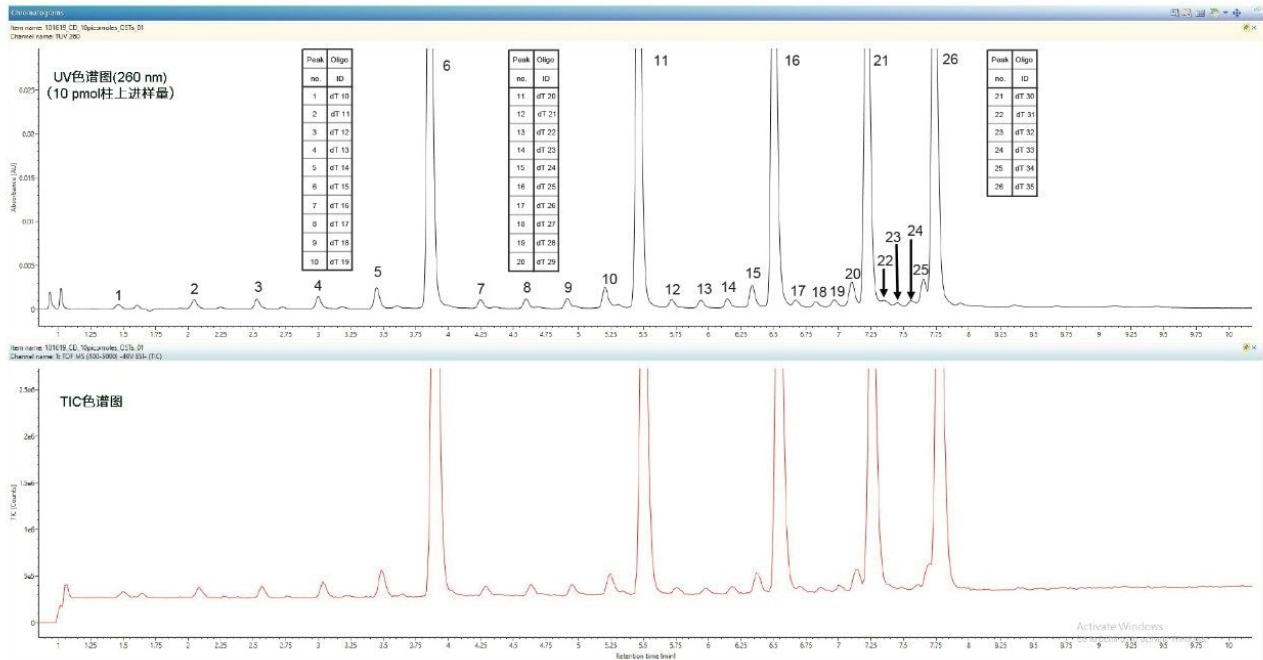
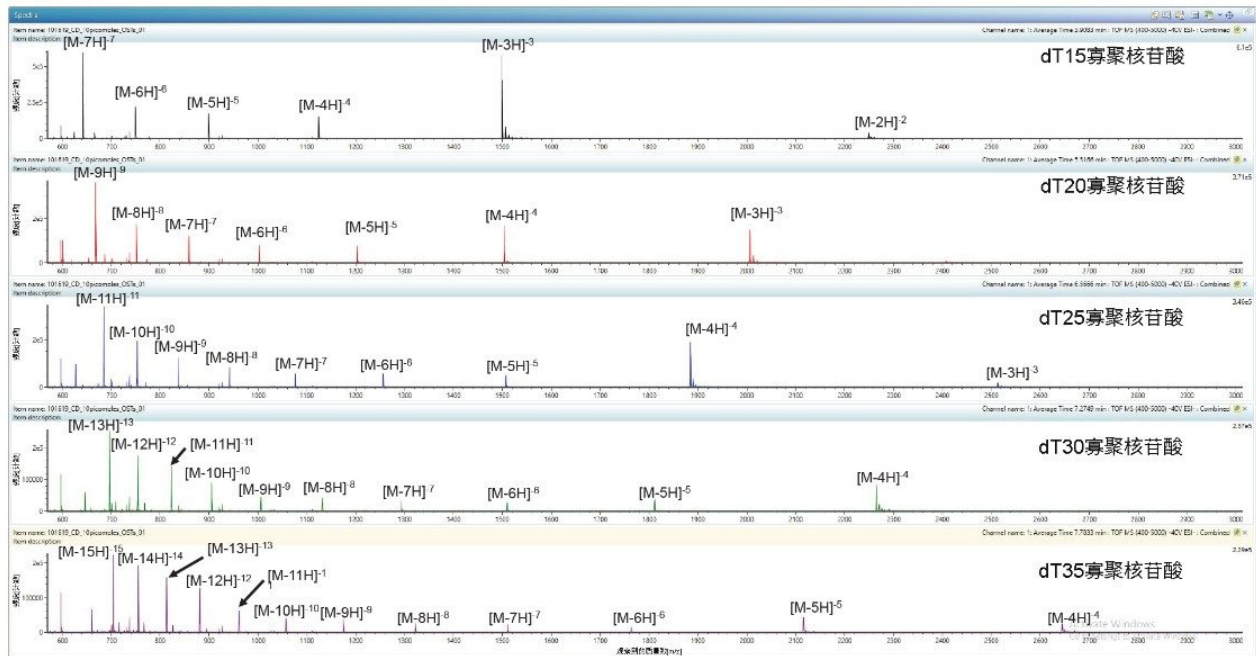


图2. OST MassPREP标准品中主要和次要寡聚核苷酸组分的TUV和TIC分离色谱图。五种主要寡聚核苷酸（dT15、dT20、dT25、dT30和dT35）的柱上进样量各为10 pmol。根据TIC色谱图中各寡聚核苷酸峰的去卷积平均质量数鉴定峰，结果见插图。

3A.



3B.

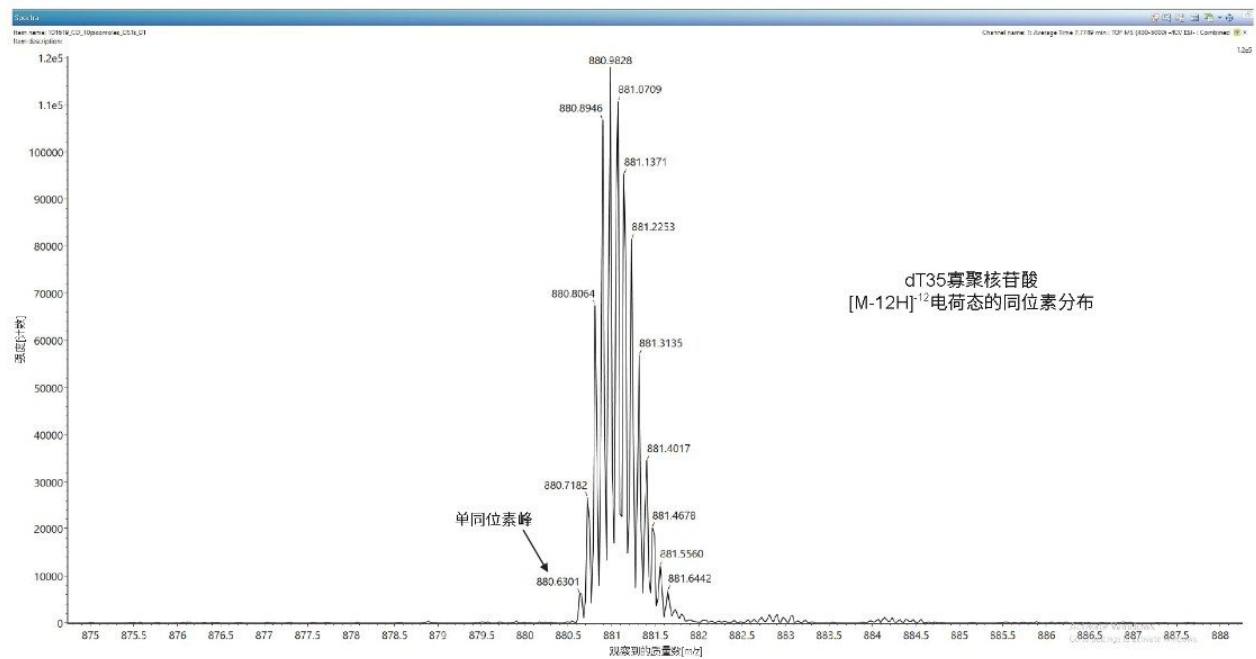


图3. OST MassPREP标准品中五种主要组分的ESI-MS谱图(A)。检出的所有电荷态谱图均呈双峰分布（采用离子对RP条件分离寡聚核苷酸化合物时的典型特征）。dT35寡聚核苷酸[M-12H]⁻¹²电荷态(10,585 Da MW)的详细视图

，其中展示了 $m/z=880.6301$ 处的单同位素峰信号(B)。BioAccord系统的质量分辨率 $>10,000$ ，能够分离中等大小寡聚核苷酸的高电荷态。

根据图2所示UV色谱图中提供的数据（每种寡聚核苷酸组分的保留时间），在waters_connect中创建自动化数据处理方法，对UV色谱图中的26种寡聚核苷酸组分全部进行峰积分，计算每种寡聚核苷酸的丰度。此外，该处理方法还将BayesSpray去卷积算法用于同一组分（采集自TIC谱图）的原始ESI-MS谱图，从而准确计算平均去卷积质量数。数据处理结果的截图见图5，其中列出了方法预测的寡聚核苷酸准确平均质量数、实验测定的质量数以及对应的质量精度误差。在分析的所有组分中，质量精度误差均低于15 ppm（不受丰度影响），26种组分测定结果的综合质量精度误差为5.3 ppm。

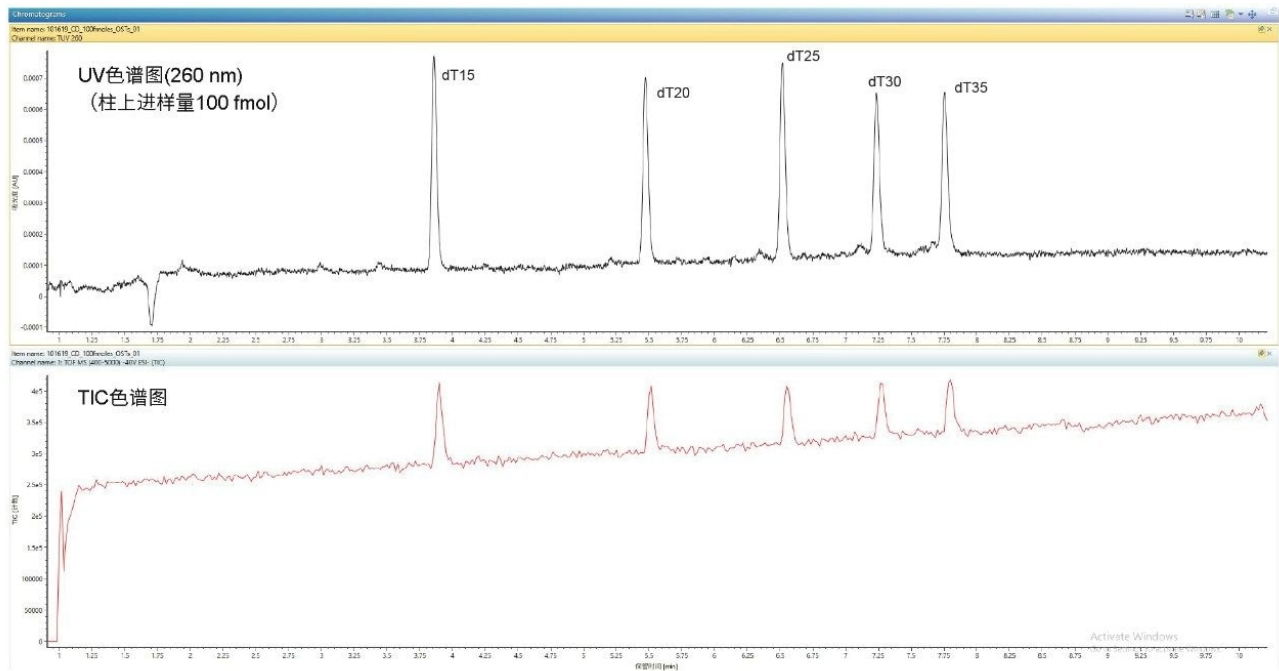


图4. 展示BioAccord系统在1 μM OST标准品稀释100倍（上样量100 fmol）时性能的TUV和TIC色谱图。五种主要寡聚核苷酸均在UV和TIC色谱图中清楚检出，表明该LC-MS系统和方法的灵敏度足以检出微量寡聚核苷酸杂质。

Component Summary								
▲	Protein name	Modifiers	Response	Observed mass (Da)	Expected mass (Da)	Mass error (mDa)	Mass error (ppm)	Observed RT (min)
6	dT15		7606760	4500.8799	4500.93310	-53.2	-11.8	3.90
7	dT16		121148	4805.0860	4805.12630	-40.3	-8.4	4.28
8	dT17		131039	5109.2835	5109.31940	-35.9	-7.0	4.63
9	dT18		124778	5413.4809	5413.51260	-31.7	-5.9	4.95
10	dT19		256082	5717.6622	5717.70580	-43.6	-7.6	5.25
11	dT20		7561908	6021.8424	6021.89900	-56.6	-9.4	5.50
12	dT21		78630	6326.0595	6326.09220	-32.7	-5.2	5.75
13	dT23		67818	6934.4747	6934.47850	-3.8	-0.5	6.18
14	dT24		260808	7238.5879	7238.67170	-83.8	-11.6	6.37
15	dT25		9023372	7542.8419	7542.86490	-23.0	-3.0	6.53
16	dT26		60509	7847.0650	7847.05810	6.9	0.9	6.70
17	dT27		43903	8151.2426	8151.25130	-8.7	-1.1	6.87
18	dT14		319470	4196.6933	4196.73990	-46.6	-11.1	3.48
19	dT28		70344	8455.4479	8455.44440	3.5	0.4	7.00
20	dT29		252132	8759.6296	8759.63760	-8.0	-0.9	7.13
21	dT30		5854481	9063.8378	9063.83080	7.0	0.8	7.25
22	dT31		25097	9368.1131	9368.02400	89.1	9.5	7.35
23	dT32		20615	9672.1540	9672.21720	-63.2	-6.5	7.45
24	dT33		36178	9976.4639	9976.41030	53.6	5.4	7.57
25	dT34		242194	10280.6710	10280.60360	67.4	6.6	7.65
26	dT35		4224434	10584.8940	10584.79670	97.3	9.2	7.77

图5. *waters_connect*自动处理方法结果截图。OST样品中全部26种寡聚核苷酸组分均可检出并测定含量，质量精度误差低于15 ppm且不受自身丰度影响。

表1详细汇总了每种寡聚核苷酸组分的元素组成、RT（保留时间）和丰度(%)以及准确平均去卷积质量数计算结果和质量数误差。图5和表1所示结果清楚地表明了*waters_connect*工作流程能够对主要寡聚核苷酸及其杂质进行快速、准确的纯度分析以及完整质量数确认。

峰编号	寡聚核苷酸鉴定结果	元素组成					保留时间 (min)	丰度 (%)	平均质量数(Da)	质量精度 (ppm)
		碳	氢	氮	氧	磷				
1	dT10	100	131	20	68	9	1.50	0.29	2979.9672	3.5
2	dT11	110	144	22	75	10	2.08	0.28	3284.1604	-2.8
3	dT12	120	157	24	82	11	2.57	0.34	3588.3536	6.2
4	dT13	130	170	26	89	12	3.03	0.45	3892.5467	5.6
5	dT14	140	183	28	96	13	3.48	0.77	4196.7399	-11.1
6	dT15	150	196	30	103	14	3.90	19.76	4500.9331	-11.8
7	dT16	160	209	32	110	15	4.28	0.31	4805.1263	-8.4
8	dT17	170	222	34	117	16	4.63	0.34	5109.3195	-7.2
9	dT18	180	235	36	124	17	4.95	0.36	5413.5126	-5.9
10	dT19	190	248	38	131	18	5.25	0.84	5717.7058	-7.6
11	dT20	200	261	40	138	19	5.50	17.62	6021.8990	-9.4
12	dT21	210	274	42	145	20	5.75	0.29	6326.0922	-5.2
13	dT22	220	287	44	152	21	5.98	0.30	6630.2854	0.0
14	dT23	230	300	46	159	22	6.18	0.34	6934.4785	-0.5
15	dT24	240	313	48	166	23	6.37	0.79	7238.6717	-11.6
16	dT25	250	326	50	173	24	6.53	18.94	7542.8649	-3.0
17	dT26	260	339	52	180	25	6.70	0.19	7847.0581	0.9
18	dT27	270	352	54	187	26	6.87	0.20	8151.2513	-1.1
19	dT28	280	365	56	194	27	7.00	0.27	8455.4444	0.4
20	dT29	290	378	58	201	28	7.13	0.99	8759.6376	-0.9
21	dT30	300	391	60	208	29	7.25	16.69	9063.8308	0.8
22	dT31	310	404	62	215	30	7.35	0.29	9368.0240	9.5
23	dT32	320	417	64	222	31	7.45	0.19	9672.2172	-6.5
24	dT33	330	430	66	229	32	7.56	0.19	9976.4104	5.4
25	dT34	340	443	68	236	33	7.65	0.96	10280.6036	6.6
26	dT35	350	456	70	243	34	7.77	18.01	10584.7967	9.2
									RMS ERROR:	5.3 ppm

表1. MassPREP OST标准品中鉴定出的26种寡聚核苷酸组分。使用BioAccord LC-MS系统分析每种寡聚核苷酸时，准确平均质量数测定结果的质量精度误差均低于15 ppm。

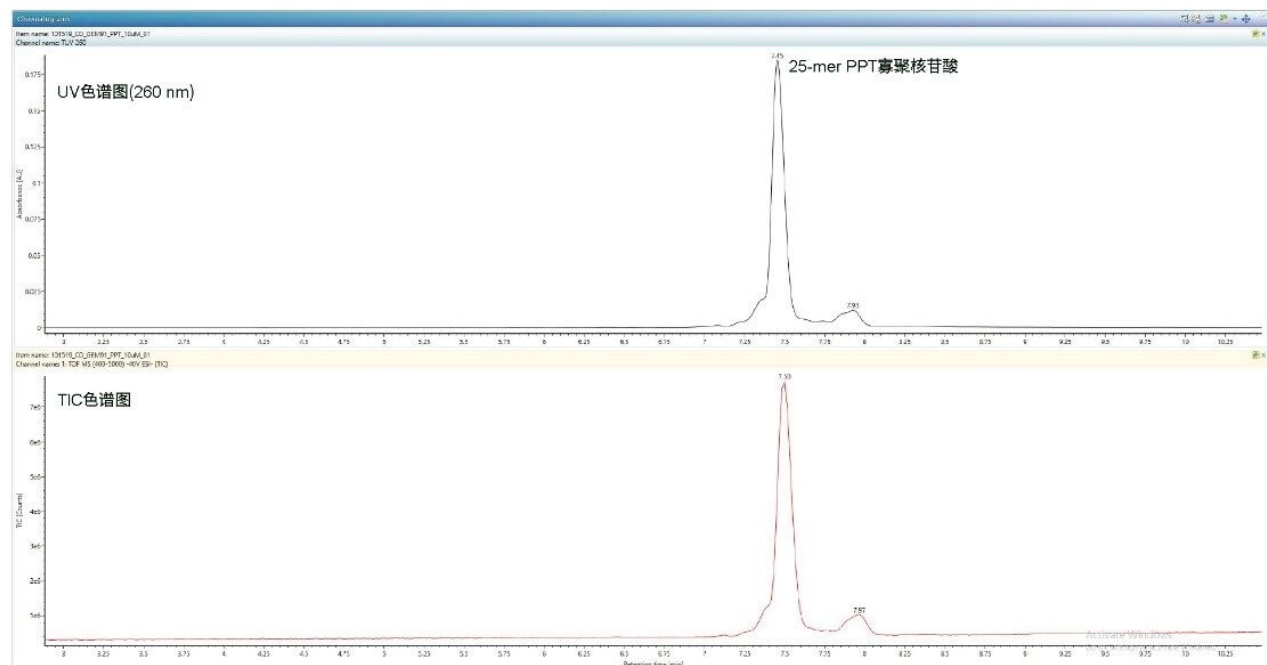
为证明BioAccord LC-MS系统用于寡聚核苷酸分析时的灵敏度，本研究还使用相同的仪器分析了经过100倍稀释的OST样品(10 nM)。该样品（五种主要寡聚核苷酸的柱上进样量为100 fmol）的UV和TIC色谱图如图5所示。两张谱图中五种主要组分均清晰可见，表明BioAccord系统在光学检测和质谱检测模式下均能够检出微量的寡聚核苷酸。

寡聚核苷酸类药物包含一段天然DNA/RNA序列，通常需要进行化学修饰以防止被天然存在的核酸酶降解。化学修饰主要有三种类型，包括骨架修饰、糖修饰和核酸碱基修饰。寡聚核苷酸类药物最常使用骨架修饰和糖基修饰，但对于分子诊断用途的寡聚核苷酸，则首选核酸碱基修饰。首先介绍的骨架修饰是以硫原子取代磷酸骨架中的氧原子，从而得到硫代磷酸化(PPT)寡聚核苷酸。此类型分子需要使用独有的同位素模型进行多电荷去卷积以得到准确平均质量数。PPT寡聚核苷酸同位素模型考虑了硫同位素的天然丰度。为展示PPT寡聚核苷酸的完整蛋白质质量

数分析，本研究使用BioAccord系统以及与OST寡聚核苷酸分析相同的实验条件分析了25 mer全硫代磷酸化寡聚核苷酸（序列为5'-C*T*C*T*C* G*C*A*C*C* C*A*T*C*T* C*T*C*T*C* C*T*T*C*T*-3'）。该寡聚核苷酸的UV和TIC谱图如图6A所示。按照元素组成(C₂₃₇ H₃₁₀ N₇₂ O₁₃₁ P₂₄ S₂₄)进行计算，该寡聚核苷酸的准确平均质量数为7,776.3314 Da。在waters_connect中使用BayesSpray和PPT寡聚核苷酸同位素模型对25 mer PPT寡聚核苷酸的ESI-MS谱图（图6B）进行多电荷去卷积，然后将去卷积质量数与预测的准确平均质量数进行比较。

如waters_connect报告所示（见图6B插图），测得的质量数误差为1.5 ppm。显然，在使用PPT寡聚核苷酸同位素模型对硫代磷酸化寡聚核苷酸进行去卷积时，BioAccord系统能够测定准确质量数。

6A.



6B.

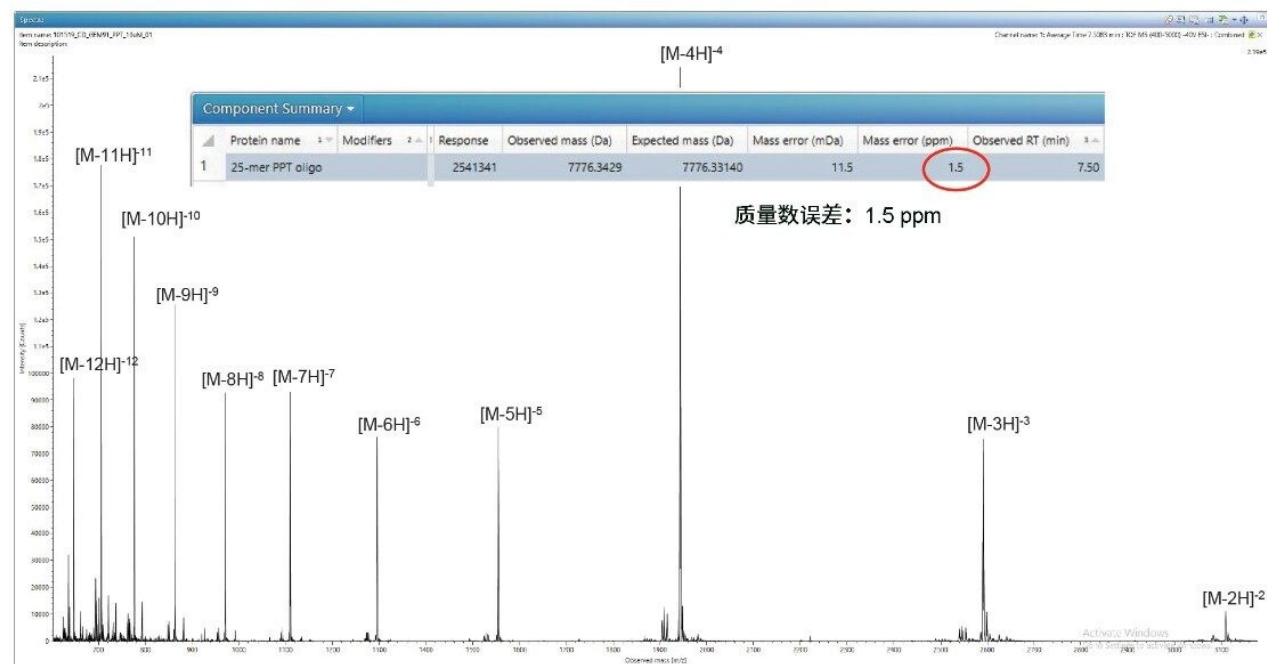


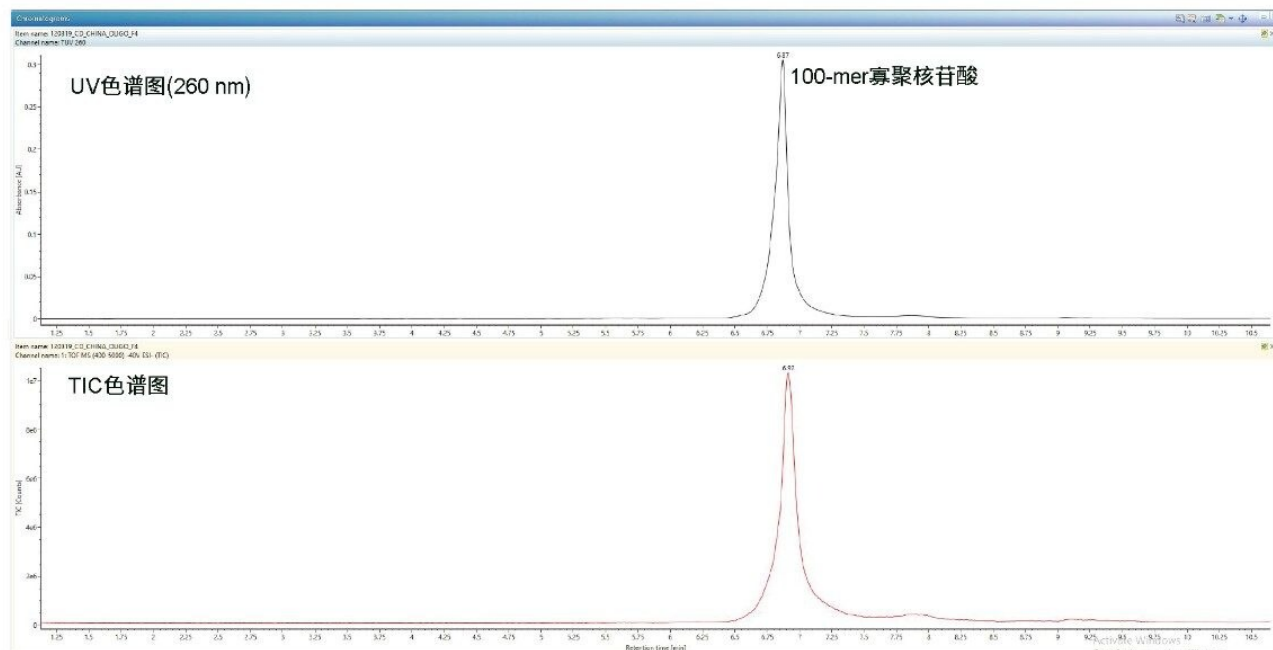
图6. 25 mer全硫代磷酸化(PPT)寡聚核苷酸的TUV和TIC色谱图(A), 以及25 mer PPT寡聚核苷酸的ESI-MS谱图(B)。插图为waters_connect处理方法中的截图, 表明去卷积质量数测定结果与MW计算结果仅相差1.5 ppm。

接下来的实验将介绍CRISPR应用领域常用的长寡聚核苷酸分析。使用BioAccord系统和经过改良的10 min梯度（梯度开始为35%洗脱液B，梯度结束为45%洗脱液B，洗脱液B：3.5 mM TEA，40 mM HFIP，溶剂均为50%甲醇）分析100 mer寡聚核苷酸（序列为5'- TGCCA GTTGC AGTTG TTTCC GAGCA GAAAC TCATC TCTGA AGAGG ATCTG GAGCA GAAAC TCATC TCTGA AGAGG ATCTG CACAC GCTGG AGCTG CCGCG-3'）。对应的UV和TIC色谱图（见图7A）表明，主要寡聚核苷酸在6.9 min时流出。

按照元素组成(C₉₇₅ H₁₂₂₃ N₃₈₄ O₅₉₅ P₉₉)进行计算，该100 mer寡聚核苷酸的平均质量数为30,907.7613 Da。在waters_connect中使用BayesSpray多电荷去卷积算法对该寡聚核苷酸的ESI-MS谱图（见图7B）进行自动去卷积，结果表明，实验测得的去卷积质量数与预期质量数相差26.9 ppm，如图7B中的截图所示。表明即使用于长寡聚核苷酸（单体数>100的寡聚体），BioAccord系统仍然能够提供高准确度的质量数确认结果。

采用本文所述工作流程时，BioAccord LC-MS系统有助于用户对各种修饰和未修饰的寡聚核苷酸进行快速、准确的完整质量数确认和纯度分析工作。

7A.



7B.

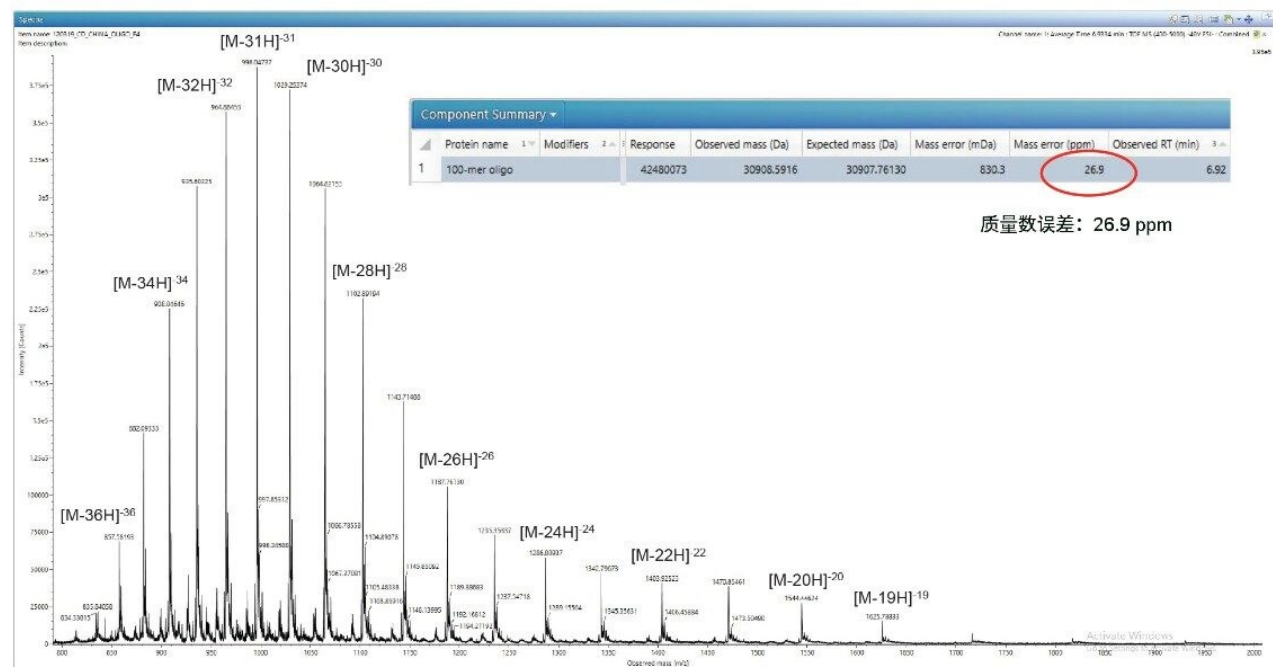


图7. 100 mer寡聚核苷酸的TUV和TIC色谱图(A)，以及100 mer寡聚核苷酸的ESI-MS谱图(B)。插图为 waters_connect处理方法中的截图，表明该寡聚核苷酸的去卷积质量数测定结果与准确平均质量数计算结果相差

26.9 ppm。

结论

- 本文所述waters_connect工作流程能够对不同长度的寡聚核苷酸(10~35 mer)以及硫代磷酸化寡聚核苷酸进行高质量精度(5~15 ppm)的完整质量数确认。
- 此外，本研究开发的自动处理方法还能够为离子对反相色谱法分离的所有寡聚核苷酸样品组分提供纯度信息。
- 这套符合法规要求的自动化LC-MS工作流程可为寡聚核苷酸的快速质量数确认和纯度分析提供稳定且简便易用的解决方案。

参考文献

1. Sharma, V.K., Watts J.K. Oligonucleotide therapeutics: Chemistry, delivery and clinical progress. *Future Med Chem*, 2015, 7(16), 2221–2242.
2. Birdsall, R. *et al.* High-throughput screening of Oligonucleotides for Identity and Purity Assignment Using the ACQUITY QDa Detector and ProMass for MassLynx. Waters Application Note, [720005681](#), 2016.
3. Birdsall, R. *et al.* Adding Mass Detection to Synthetic Oligonucleotide Analysis with the ACQUITY QDa Detector. Waters Application Note, [720005632](#), 2016.
4. Shion, H. *et al.* Developing a Novel, Integrated LC-MS Workflow for High-resolution Monitoring and characterization of Oligonucleotides. Waters Application Note, [720005821](#), 2016.
5. Skilling, J. *et al.* Beyond MaxEnt Deconvolution: Increasing the Fidelity and Universal Applicability of Mass Spectral Deconvolution Routines for Biomolecules with the Application of Bayesian Probability Theory, poster presented at the PAMS Conference (Practical Applications of Mass Spectrometry in the

Biopharmaceutical Industry), 2010, 720003756.

特色产品

生物制药专用BioAccord LC-MS系统 <<https://www.waters.com/waters/nav.htm?cid=135005818>>

ACQUITY UPLC I-Class PLUS系统 <<https://www.waters.com/134613317>>

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

720006820ZH, 2020年4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