

使用MaxPeak HPS技术提高寡核苷酸杂质的回收率和定量性能

Brooke M. Koshel, Robert E. Birdsall, Ying Qing Yu

Waters Corporation

摘要

离子对反相色谱是分离合成寡核苷酸杂质的一种常用技术。众所周知，在传统离子对方法条件下，寡核苷酸对金属表面具有很高的亲和力，因此非常难分析。ACQUITY Premier色谱柱和LC系统采用MaxPeak高性能表面技术设计，旨在解决寡核苷酸等金属敏感分析物的分析变异性。ACQUITY Premier解决方案开箱即用，无需经过老化或钝化处理，这正是不锈钢色谱柱和具有金属流路的LC系统所需要的性能。此外，ACQUITY Premier解决方案经证明可以提高回收率，改善灵敏度和检测限，并在痕量杂质的光学检测工作流程中提供更可靠的定量。

优势

- 开箱即用，无需经过老化或钝化处理
 - 动态范围更宽，线性程度更高
 - 增强痕量杂质分析的重现性和定量性能
 - 提高评估实验中所有类型寡核苷酸的回收率
-

简介

随着人们对新型药物的探索不断深入，且这类药物已经投入市场，核酸药物持续引发关注。合成寡核苷酸就是其中一种，它们是通过一系列偶联反应合成的，这些偶联反应将一个核苷酸与延长肽链中的下一个核苷酸连接起来。考虑到化学合成的性质，杂质类型通常是可预测的，但随着寡核苷酸长度增加，杂质分布变得越来越复杂。从这些杂质中分离和纯化目标分析物对于开发和生产活动至关重要，但也面临着挑战。

离子对反相色谱(IP-RP)是寡核苷酸分析的首选方法。典型方法条件采用的pH大约为7或8，但寡核苷酸具有极强的酸性，在常规条件下会发生去质子化。寡核苷酸上带负电荷的磷酸盐骨架容易因离子相互作用而与不锈钢色谱柱和LC流路的金属表面发生非特异性吸附，导致峰形和回收率变差，难以实现可靠定量，对于痕量物质尤其如此。当在寡核苷酸结构用碱基、糖或骨架偶联或修饰时，非特异性吸附问题可能会更严重，因为这些改变会增加寡核苷酸对金属表面的亲和力。为缓解这一现象，实验室采用了各种策略，包括老化或钝化色谱柱和LC系统或在流动相中添加金属螯合剂。老化或钝化通常是指重复进样分析物以阻断金属表面的活性位点。使用磷酸溶液对LC系统进行化学钝化是一种更激进的方法，有时在处理特别敏感的分析物时会使用这种方法。虽然这些技术可能提供临时解决方案，但它们可能极为繁琐，并且无法一劳永逸。

MaxPeak高性能表面(HPS)技术经过专门设计，通过在金属表面和分析物之间提供有机/无机屏障，减少金属敏感分析物的分析变异性¹。ACQUITY Premier色谱柱和ACQUITY Premier系统采用MaxPeak HPS技术设计，共同构成ACQUITY Premier解决方案。本研究在基于UV的寡核苷酸分析中，对比评价了ACQUITY Premier解决方案与常规不锈钢色谱柱和具有金属流路的LC系统，旨在解决与非特异性吸附相关的挑战。ACQUITY Premier解决方案的灵敏度和回收率更高，由此提高了定量的重现性，最终，结果可靠性也得以提升，同时无需花费额外的时间老化或钝化表面。

实验

样品描述

表1中报告了所有分析物以及各自的序列。制备各分析物的高浓度储备液并进一步稀释，如相应图中所示。

分析物	序列
OST标准品	15、20、25、30和35 mer寡聚脱氧胸苷
FAM-25mer	FAM-TTT GAC TTA GAC TTA GAC TTA GTT T
Cy3-25mer	Cy3-TTT GAC TTA GAC TTA GAC TTA GTT T
GEM91	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*

表1.寡核苷酸分析物和序列信息。Waters MassPREP寡核苷酸标准品（部件号：[186004135](#)）含有长度为15、20、25、30和35个核苷酸(nt)的寡聚脱氧胸苷各约1 nmol，复溶于250 μ L溶液中，得到4 μ M的浓度。制备100 μ M荧光素染料偶联物(FAM-25mer)和花青染料偶联物(Cy3-25mer)的储备液。制备浓度为130 μ M的GEM91（一种全硫代磷酸化反义寡核苷酸）。进一步稀释储备液以供分析。

液相色谱条件

液相色谱系统：
ACQUITY UPLC
H-Class PLUS
Bio二元系统
ACQUITY
Premier系统

色谱柱：
ACQUITY UPLC
BEH C₁₈寡核苷酸分析专用柱，
130 Å, 1.7 μ m,
2.1 \times 50 mm（
部件号
：186003949）
ACQUITY
Premier C₁₈寡核苷酸分析专用
柱, 130 Å, 1.7

μm , 2.1×50
mm (部件号
: 186009484)

波长: TUV检测, 波长
260 nm

进样体积: 4 μL

柱温: 60 $^{\circ}\text{C}$

流速: 0.200 mL/min

图1:

流动相A: 100 mM
TEAA, pH约为7

流动相B: 乙腈

梯度: FAM-25mer: 流
动相B在10 min
内从9%增加至
19%

图2、3和4:

流动相A: 8.6 mM
TEA, 100 mM
HFIP, pH约为
8.25

流动相B: 甲醇

梯度： OST标准品： 流
动相B在10 min
内从12%增加至
22%

FAM-25mer： 流
动相B在10 min
内从14%增加至
24%

Cy3-25mer： 流
动相B在10 min
内从21%增加至
31%

PS： 流动相B在
10 min内从
14%增加至24%

数据管理

Empower 3色谱数据软件FR4（除非另有说明）

结果与讨论

无需老化和钝化处理：对比评价不锈钢与ACQUITY Premier色谱柱技术

在分析寡核苷酸等金属敏感分析物时，色谱柱和LC系统的钝化或老化是实现所需结果的重要事项。如果未进行适当的老化或钝化，分析物会与金属表面的活性位点相互作用，导致峰畸变和回收率低。首次使用新的不锈钢色谱柱时，峰面积预计会在进样系列中逐渐增加，直到这些活性位点饱和，之后峰面积的重现性会更高。

图1显示了使用TEAA离子对体系、不锈钢色谱柱以及一套成熟的LC系统分离FAM-25mer杂质的结果，该系统在蛋白质、肽和寡核苷酸的高通量常规分析中均有应用。如预期一样，观察到峰面积在进样系列中逐渐增加，直到表

面被分析物有效老化或钝化（图1A，插图）。不过，FAM-25mer n-1杂质即使在色谱柱经过适当老化后仍未观察到回收（图1A）。当使用同一LC系统搭配ACQUITY Premier色谱柱时，主峰前延肩峰上的n-1杂质和额外的未鉴定杂质得到分离（图1B）。由于TEAA不适用于MS检测，因此通过加标研究鉴定了n-1杂质（数据未显示）。经计算，n-1杂质的含量约为0.1%，六次进样的RSD百分比为2.4%，表明仅需一次进样就能可靠定量微量杂质。从图1B的插图可以看出，主峰的峰面积也在整个进样系列中保持不变，没有出现在使用不锈钢色谱柱时观察到的老化效应。由此证明，ACQUITY Premier色谱柱开箱即用，不同于不锈钢色谱柱，无需耗费分析物进行老化。

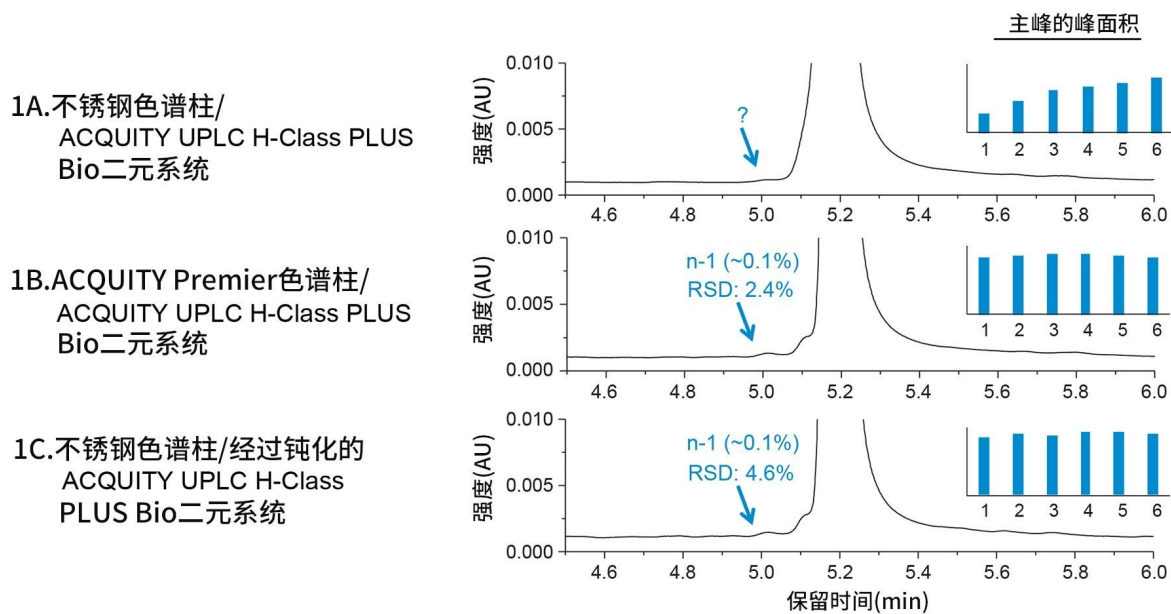


图1. 不锈钢色谱柱和常规LC系统需要经过适当的老化和钝化后才能使FAM-25mer的n-1杂质分离达到理想结果。1A. 使用不锈钢色谱柱时，主峰的峰面积在进样系列中逐渐增加，直到金属表面的活性位点被阻断（插图）。如色谱图所示，即使通过后续进样完成色谱柱老化后，n-1杂质也无法回收。1B. ACQUITY Premier色谱柱开箱即用，无需老化（插图）。在六次进样中，n-1杂质的定量结果约为0.1%，RSD为2.4%。1C：n-1杂质只能在LC系统钝化后得到回收，表明分析物在色谱柱和LC系统中都有损失。如插图所示，主峰的峰面积在进样系列中保持不变，因为色谱柱在酸钝化之前已经过老化。

方法条件：将FAM-25mer储备液稀释至2.22 pmol/μL。MPA：100 mM TEAA，pH约为7；MPB：乙腈；梯度条件：流动相B在10分钟内从9%增加至19%；柱温：60°C，检测波长：260 nm。使用MassLynx v4.2 SCN 993收集数据。

为使LC系统能在使用常规不锈钢色谱柱时回收n-1杂质，使用30%磷酸溶液进行钝化处理。需要注意的是，虽然磷酸经常用于LC表面钝化，但这是一种极为激进的处理方法，应谨慎执行。此外，还必须用水冲洗LC系统长达24小时，确保去除系统中的痕量磷酸。只有在经过适当的色谱柱老化和酸冲洗后，n-1峰（和额外的肩峰）才能得到回收（图1C）。与使用ACQUITY Premier色谱柱获得的结果相似，n-1峰的含量约为0.1%，在进样系列中的RSD百分比为4.6%。由于不锈钢色谱柱的结果因LC系统钝化而有所改善，表明即使在系统和色谱柱表面都已被分析物钝

化后，金属LC组件和色谱柱也存在可见的分析物损失。因此，当ACQUITY Premier色谱柱与ACQUITY Premier系统搭配使用时，可以进一步提高回收率。

使用MaxPeak HPS技术扩展动态范围并增强线性：了解色谱柱和LC系统对样品损失的影响

尽管分析物流路的表面积明显小于不锈钢色谱柱的表面积，但先前的示例表明，将ACQUITY Premier色谱柱与ACQUITY Premier系统搭配使用可以获得理想回收率。为了评估不同色谱柱和系统产生的影响，在三组条件下评估了GEM91在TEA-HFIP中的稀释系列：不锈钢色谱柱和常规系统、ACQUITY Premier色谱柱和常规系统以及ACQUITY Premier色谱柱和ACQUITY Premier系统。将GEM91储备液进一步稀释至2.6 pmol/ μ L，重复进样三次，直到无法检出分析物(SNR<3)。所有色谱柱在使用前都已经过老化处理。尽管ACQUITY Premier色谱柱不需要老化，但不锈钢色谱柱和ACQUITY Premier色谱柱之间的进样组保持一致。使用相同的样品前处理方案和流动相，在同一天使用不锈钢色谱柱和常规系统以及ACQUITY Premier色谱柱和系统运行稀释系列。第2天使用新制样品和流动相运行ACQUITY Premier色谱柱和常规系统，避免任何潜在的降解。表2报告了三次进样系列的平均峰面积以及三组条件下相应的RSD百分比。不锈钢色谱柱和常规系统在整个稀释系列中的回收率最低（根据峰面积测定）。使用ACQUITY Premier色谱柱和常规系统时回收率有所提高，但使用ACQUITY Premier色谱柱和系统时的回收率更高。全套ACQUITY Premier解决方案更高的回收率促成了更低的检测限，以及整个稀释系列中更低的RSD百分比。

载样量 (ng)	不锈钢色谱柱/ ACQUITY UPLC H-Class PLUS Bio二元系统		ACQUITY Premier色谱柱/ ACQUITY UPLC H-Class PLUS Bio二元系统		ACQUITY Premier色谱柱/ ACQUITY Premier LC系统	
	峰面积 (N=3)	%RSD	峰面积 (N=3)	%RSD	峰面积 (N=3)	%RSD
80.00	178627	1.27	221040	0.53	254558	0.26
40.00	84705	0.92	103585	1.30	125390	0.38
20.00	39348	1.97	51496	0.17	61893	0.72
10.00	16577	4.13	24547	1.17	29985	1.29
5.00	7857	3.10	12180	0.55	13757	1.90
2.50	2594	7.04	5818	0.89	6846	0.14
1.25	1002	9.16	2776	1.57	2958	2.07
0.625	348.03	12.16	1458	2.39	1596	0.30
0.313			596.82	8.57	689.76	2.30
0.156			可检出, 但SNR <3		257.35	2.24
0.078					可检出, 但SNR <3	

表2.GEM91稀释系列的动态范围。使用ACQUITY Premier解决方案（ACQUITY Premier色谱柱和ACQUITY Premier系统）时的检测限最低。此外，使用ACQUITY Premier解决方案时，数据定量的重现性更高，整个稀释系列中的低RSD百分比证明了这一点，即使在低载样量下也是如此。

方法条件：将GEM91储备液稀释至2.6 pmol/μL，并运行两倍稀释系列，直到无法再检出分析物。MPA：8.6 mM TEA，100 mM HFIP，pH约为8.25；MPB：甲醇；梯度条件：流动相B在10分钟内从14%增至24%；柱温：60°C，检测波长：260 nm。使用Empower 3 FR4收集数据。

我们可以通过每个稀释系列的校准曲线进一步解析这些结果，以评估动态范围（图2和3）。首先在一张图中绘制每个数据集的校准曲线，发现每条曲线的斜率各不相同（图2）。这表明，即使耗费分析物老化和钝化色谱柱和系统，分析物回收率也存在差异。尽管曲线似乎呈线性且R平方值接近1，但通过单独绘制每个数据集的校准曲线图并放大显示较低载样量的情况可知，不锈钢色谱柱和系统在低载样量下的数据点不呈线性（图3）。使用ACQUITY Premier色谱柱和常规系统时回收率有所提高，但使用ACQUITY Premier系统后回收率得到进一步提高。ACQUITY Premier色谱柱和系统搭配使用可在整个动态范围内提供更优异的线性、更低的检测限以及更高的重现性（RSD百分比最低）。这对于杂质分析来说尤为重要，因为回收率可以再次与0.1%水平的检测相关（报告的最高和最低峰面积计数分别为254,558与257），检测覆盖近三个数量级，而常规系统和色谱柱只覆盖两个数量级。只有ACQUITY Premier解决方案具有这些性能，有助于更可靠地检测和定量痕量杂质。

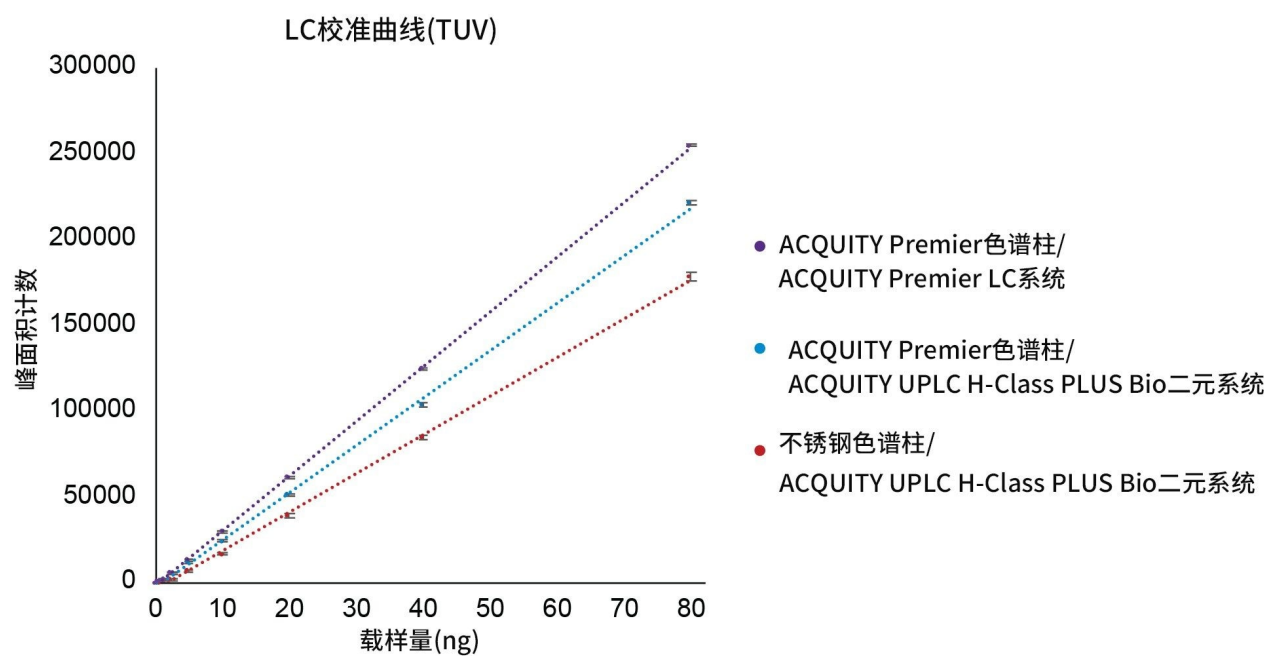
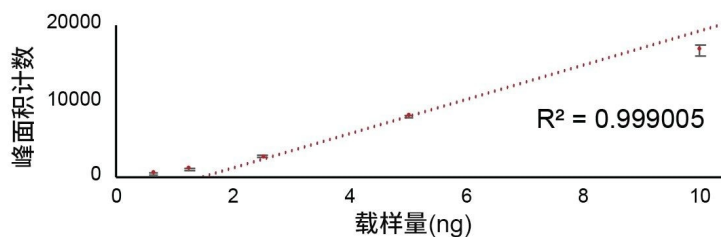


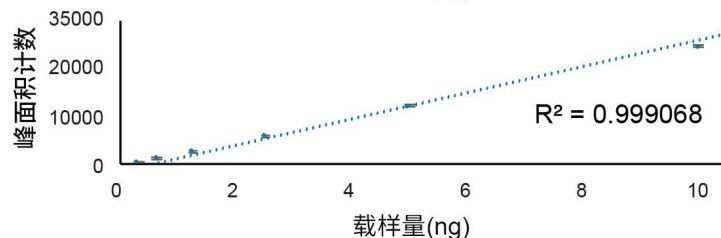
图2.使用不锈钢色谱柱和常规系统（红色）、ACQUITY Premier色谱柱和常规系统（蓝色）以及ACQUITY Premier色谱柱和系统（紫色）得到的GEM91校准曲线。绘图使用表2中报告的峰面积。不同的斜率表明所测试的色谱柱和系统的回收率存在明显差异。

方法条件：将GEM91储备液稀释至 $2.6 \text{ pmol}/\mu\text{L}$ ，并运行两倍稀释系列，直到无法再检出分析物。MPA：8.6 mM TEA，100 mM HFIP，pH约为8.25；MPB：甲醇；梯度条件：流动相B在10分钟内从14%增至24%；柱温：60°C，检测波长：260 nm。使用Empower 3 FR4收集数据。

3A. 不锈钢色谱柱/
ACQUITY UPLC H-Class PLUS
Bio二元系统



3B. ACQUITY Premier 色谱柱/
ACQUITY UPLC H-Class PLUS
Bio二元系统



3C. ACQUITY Premier 色谱柱/
ACQUITY Premier LC 系统

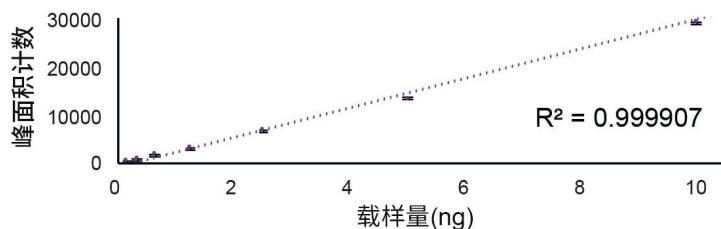


图3. 使用不锈钢色谱柱和系统(3A)、ACQUITY Premier 色谱柱和常规系统(3B)以及ACQUITY Premier 色谱柱和系统(3C)得到的GEM91稀释系列的动态范围图。绘图使用表2中报告的峰面积。对所有数据点进行线性回归，但放大数据以突出低载样量下的偏差。

方法条件：将GEM91储备液稀释至 $2.6 \text{ pmol}/\mu\text{L}$ ，并运行两倍稀释系列，直到无法再检出分析物。MPA：8.6 mM TEA，100 mM HFIP，pH约为8.25；MPB：甲醇；梯度条件：流动相B在10分钟内从14%增至24%；柱温：60°C，检测波长：260 nm。使用Empower 3 FR4收集数据。

针对各种寡核苷酸类型比较MaxPeak HPS技术与常规技术

GEM91的分析显示，与常规技术相比，ACQUITY Premier 色谱柱与ACQUITY Premier 系统搭配使用具有明显优势。因此，有必要了解是否可以在其他类型的寡核苷酸中观察到同样的优势。进一步稀释OST标准品、FAM-25mer和Cy3-25mer的储备液，以便与GEM91比较在TEA-HFIP中使用亚纳克级柱上载样量的条件下，常规技术与MaxPeak HPS技术的分离性能。调整色谱梯度，使分析物在大约10分钟梯度的中间洗脱。OST标准品、FAM-25mer和GEM-91采用的梯度相似，而Cy3-25mer需要将甲醇含量增加至近2倍才能洗脱。

OST标准品被选作一种预期表现良好的寡核苷酸分析物，因为它是由重复dT单元构成的寡聚物并且不包含修饰。除了磷酸盐骨架外，预计它对金属表面的亲和力不会特别高。尽管与治疗应用领域相比，荧光标记的寡核苷酸更能代表生物应用领域中用于引物或探针的寡核苷酸，但它们还代表另一类未修饰的寡核苷酸（荧光标记除外）。据了

解，这些标记使亲水性寡核苷酸具有疏水性，其中FAM偶联物仅具有轻微疏水性，而Cy3偶联物具有极强的疏水性。这些染料偶联物的疏水程度在文献中有详细描述，也可以通过洗脱梯度做出明显判断。寡核苷酸碱基、糖和骨架上的额外修饰会影响金属结合亲和力²。GEM91是一种全硫代磷酸化寡核苷酸，据了解它的回收率很差，从前面的稀释系列示例中也可以推断出这一点。

与GEM91一样，使用相同的样品前处理方案和流动相，在同一天使用不锈钢色谱柱和常规系统以及ACQUITY Premier色谱柱和系统运行相样品，尽可能减少实验差异。调整上样量，使ACQUITY Premier解决方案分析的所有样品的峰面积相当（峰面积计数约为2000），假设色谱柱或流路的金属表面上没有分析物损失。这可以使不同样品类型之间的比较更加公平，因为痕量物质（即峰面积计数较低）的回收率受到的影响更大。

如预期一样，回收率取决于分析物（图4）。比较常规技术与MaxPeak HPS技术时，OST标准品显示出序列较短且回收率较低的总体趋势。对于15mer，常规技术和MaxPeak HPS技术之间的峰面积差异约为2倍。尽管MaxPeak HPS技术使标准品中所有物质的峰面积计数都有所增加，但较长的寡核苷酸不容易受非特异性吸附的影响。与常规技术相比，MaxPeak HPS技术也更容易区分整个色谱图中的失败序列。

不锈钢色谱柱/
ACQUITY UPLC H-Class PLUS Bio二元系统

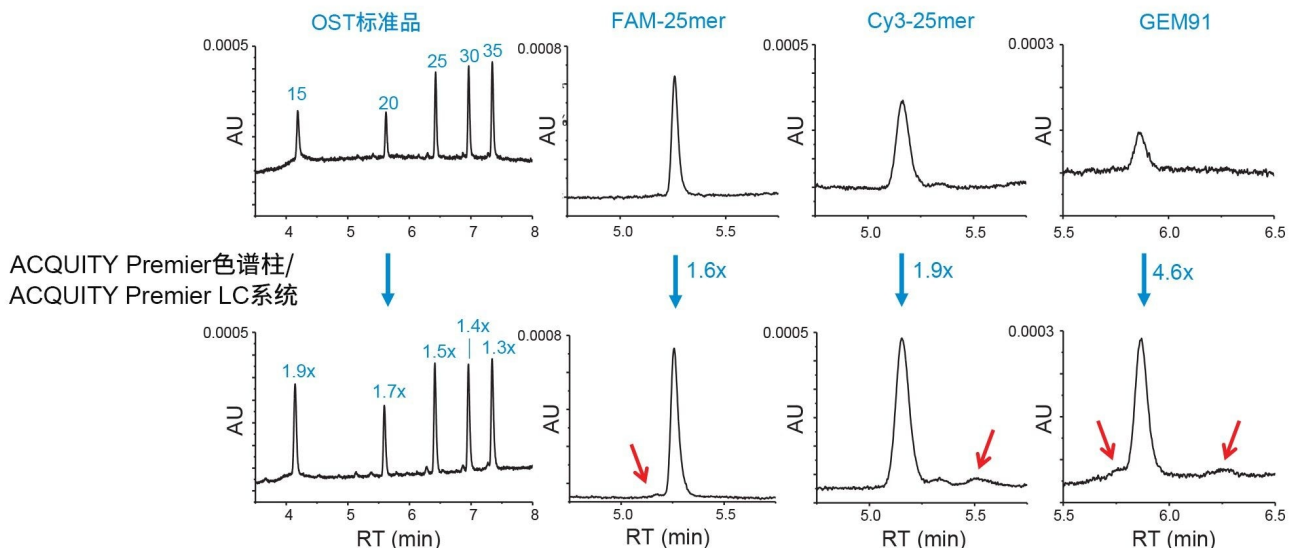


图4.ACQUITY Premier解决方案使各种类型的寡核苷酸在亚纳克级载样量下的回收率有所提高。调整上样量，使ACQUITY Premier解决方案得到的峰面积结果相当（峰面积计数约为2000），从而更好地归类样品类型。最终柱上载样量约为0.3~0.6 ng。ACQUITY Premier色谱图上的红色箭头突出显示了使用常规技术看不到的其他杂质。此外在OST标准品中还可以看到，使用ACQUITY Premier解决方案时还可以更好地回收失败序列。（所有常规色谱柱和LC系统的数据集均采用了空白扣除，对齐RT以更好地显示数据。）

在修饰过的寡核苷酸类型中可以看到更明显的差异。使用MaxPeak HPS技术时，FAM-25 mer的回收率提高至1.6倍，这与相同长度的未修饰聚dT标准品非常相似，该标准品在使用MaxPeak HPS技术时的回收率提高至1.5倍。（应该注意的是，FAM-25mer使用的流动相为TEA-HFIP，而不是TEAA，因此预期不会出现与图1相同的色谱图。）MaxPeak HPS技术使Cy3-25mer的峰面积大约增加至2倍，表明在使用常规技术时，该样品发生了更严重的分析物吸附。如前所述，使用MaxPeak HPS技术时，GEM91的回收率提高至4倍。此外，对比色谱图可以发现，与常规技术相比，使用MaxPeak HPS技术时，在这些低载样量下仍然可以轻松检出额外的杂质。

结论

众所周知，寡核苷酸会在金属表面发生非特异性吸附，因此难以表征和定量，尤其是在分析痕量物质和低上样量

时。本研究表明，与使用不锈钢色谱柱和具有金属流路的LC系统这种更为传统的分析相比，使用ACQUITY Premier解决方案能够提高回收率，实现更可靠的杂质定量。ACQUITY Premier色谱柱与ACQUITY Premier系统搭配使用可实现理想性能，表现出更高的回收率、更低的检测限以及更高的线性和重现性。

参考资料

1. DeLano, M., Walter, T. H., Lauber, M. A., Gilar, M., Jung, M. C., Nguyen, J. M., Boissel, C., Patel, A. V., Bates-Harrison, A., Wyndham, K. D. Using Hybrid Organic-Inorganic Surface Technology to Mitigate Analyte Interactions with Metal Surfaces in UHPLC. *Anal.Chem.* 2021, Available: <https://pubs.acs.org/doi/pdf/10.1021/acs.analchem.0c05203> <<https://pubs.acs.org/doi/pdf/10.1021/acs.analchem.0c05203>> .
2. Zhou, W., Saran, R., Liu, J. Metal Sensing by DNA. *Chem.Rev.* 2017, 117, 12, 8272–8325.

特色产品

ACQUITY Premier系统 <<https://www.waters.com/waters/nav.htm?cid=135077739>>

ACQUITY UPLC H-Class PLUS Bio系统 <<https://www.waters.com/10166246>>

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

Empower色谱数据系统 <<https://www.waters.com/10190669>>

720007238ZH, 2021年11月修订

© 2022 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