Waters™

应用纪要

HILIC可用作在BioAccord系统上进行寡核苷 酸完整分子量确认的替代分离模式

Catalin E. Doneanu, Ying Qing Yu, Joseph Fredette, William J. Warren, Weibin Chen

Waters Corporation

摘要

HILIC是一种干净、经济有效的分离方法,易于纳入寡核苷酸完整分子量确认的自动工作流程。如本研究所示, BioAccord LCMS系统能够帮助waters_connect用户对小分子和中等分子寡核苷酸(至多50-mer)执行快速准确 的完整分子量确认。

优势

- 自动、合规的HILIC LC-MS工作流程经证明能够提供良好的质量精度(低于15 ppm),适合使用HILIC LC-MS 分析进行寡核苷酸完整分子量确认
- 在流动相方面,使用HILIC法分离寡合苷酸与传统的离子对反相(IP-RP)分离相比有三大优势:1)流动相成本至 少缩减10倍以上,2)毒性显著减弱以及3)LC-MS操作的流动相稳定性至少提升10倍(可稳定长达2周)
- 与采用不锈钢硬件的传统ACQUITY BEH Amide色谱柱相比,采用MaxPeak高性能表面的ACQUITY Premier
 BEH Amide色谱柱无需色谱柱老化操作,可节省色谱柱钝化时间,开箱即可直接使用

近年来,寡核苷酸类药物开始作为小分子及治疗性蛋白药物的有力补充^{1,2}。 寡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。在寡核苷酸分析中,使用离子对反相色谱法(IP-RP)分离寡核苷酸后进 行负离子ESI-MS模式质谱检测是一种广受认可的质谱分析方法。近期有研究使用该寡核苷酸分析方法,介绍了以 waters_connect控制BioAccord系统进行数据采集、处理和报告的自动化合规工作流程^{3,4}。图1展示的 BioAccord LC-MS系统是沃特世于2019年推出的一套紧凑、稳定、简便易用的平台,可用于生物药物常规分析。 本研究使用的这套完全集成的BioAccord LC-MS系统包含一套ACQUITY UPLC I-Class PLUS系统、一台可变波长 紫外(TUV)检测器以及ESI-Tof ACQUITY RDa质谱检测器,如图1所示。



图1.BioAccord LC-MS系统

在本研究中,我们使用亲水作用色谱法(HILIC)作为IP-RP的替代分离技术,研究了BioAccord LC-MS系统用于寡核苷酸完整分子量确认的能力。近期发表的两篇文章表明^{5,6},HILIC的普及性虽不如IP-RP色谱法,但它在寡核苷酸分析方面展现出独特潜力。HILIC流动相不采用离子对试剂或有毒且昂贵的挥发性改性剂(例如1,1,1,3,3,3-六氟-异丙醇,HFIP),这是考虑采用此替代分离技术的主要原因⁷。本应用纪要中的LC-MS数据来自3种不同的化合物 : 寡核苷酸polyT标准品(OSTs)、经过修饰的寡核苷酸(全硫代磷酸化25-mer寡核苷酸)以及大分子57-mer寡核 苷酸。所有数据集均以全扫描MS模式采集,并在waters_connect中使用BayesSpray质谱电荷去卷积算法进行处 理,为每种化合物生成准确的完整分子量测量值。

实验

试剂和样品前处理

醋酸铵试剂(LiChropur,产品目录号5.33004.0050)购自Millipore Sigma(美国密苏里州圣路易斯)。乙腈(LC-MS级,产品目录号34881-1L)购自Honeywell(美国卡罗来纳州夏洛特)。HPLC级去离子(DI)水使用MilliQ 系统(密理博公司,美国马萨诸塞州贝德福德)净化。使用溶剂A(10 mM醋酸铵的75%乙腈溶液)溶解 MassPREP OST(寡核苷酸分离技术)标准品(沃特世部件号: 186004135 <

https://www.waters.com/nextgen/us/en/shop/standards--reagents/186004135-massprep-

oligonucleotide-standard.html>) ,制得浓度为10 μM的溶液。25-mer全硫代磷酸化寡核苷酸(25-mer PS寡 核苷酸序列: 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')、57-mer寡核苷酸 (序列: 5'-CAA TAT TTT ACA TGA ACT GGA GGT CCG TCA ATG ACA GTG TAG GCT GGA GCT GCT TCG-3') 均购自Integrated DNA Technologies(艾奥瓦州科尔维尔)。两种寡核苷酸均使用溶剂A(10 mM醋酸铵的 75%乙腈溶液)溶解,制得浓度为10 μM的溶液。所有寡核苷酸样品的进样量均为2 μL。

LC-MS系统

BioAccord系统,包含ACQUITY UPLC I-Class PLUS系统、TUV检测器和ACQUITY RDa检测器

液相色谱条件

色谱柱:

ACQUITY Premier BEH Amide 1.7 μm, 130 Å, 2.1 x 50 mm, 部件号: 186009504

柱温:	60 °C
流速:	300 μL/min
流动相:	溶剂A: 10 mM醋酸铵、75%乙腈的去离子水溶液 溶剂B: 10 mM醋酸铵、25%乙腈的去离子水溶液
样品温度:	6 °C
样品瓶:	QuanRecovery MaxPeak样品瓶(部件号 : 186009186)
进样体积:	1 μL

梯度表

时间 (min)	流速 (mL/min)	溶剂A含量 (%)	溶剂B含量 (%)	曲线图
0.00	0.3	100	0	初始
1.00	0.3	100	0	
16.00	0.3	50	50	6
20.00	0.3	50	50	6
21.00	0.3	50	90	6
22.00	0.3	10	90	6
23.00	0.3	100	0	6
30.00	0.3	100	0	6

清洗溶剂

清除溶剂:	10 mM醋酸铵、25%乙腈的去离子水溶液			
样品管理器清洗溶剂:	10 mM醋酸铵、25%乙腈			
密封件清洗液:	20%乙腈的去离子水溶液			
质谱条件				
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质量数范围:	400-5000			
采集速率:	2 Hz			
实时质量校正标样:	waters_connect实时校正标准液(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

本研究使用了常规ACQUITY UPLC BEH Amide色谱柱(部件号: 186004800 <

https://www.waters.com/nextgen/us/en/shop/columns/186004800-acquity-uplc-beh-amide-column-130a-17--m-21-mm-x-50-mm-1-pk.html>) 和近期推出的ACQUITY Premier BEH Amide色谱柱(部件号: 186009504 < https://www.waters.com/nextgen/us/en/shop/columns/186009504-acquity-premier-behamide--column-17--m-21-mm-x-50-mm-1-pk.html>) 对Waters MassPREP寡核苷酸混标(OST标准品)进 行HILIC分离。新色谱柱属于填充亚2 μm颗粒的色谱柱系列,采用了MaxPeak高性能表面(HPS)技术⁸⁻¹²。寡核苷 酸含有一个带负电荷的磷酸盐骨架,该骨架可与常规UPLC/HPLC色谱柱中常见的金属表面(如不锈钢外壳或筛板) 相互作用。这些相互作用是造成寡核苷酸损失(色谱柱回收率低)、色谱峰形不佳或数据重现性差的常见原因 。新安装的色谱柱通常需要通过进样一系列高浓度寡核苷酸样品(柱上>20 pmol)来进行色谱柱钝化,从而减少 分析物与流路中金属表面的相互作用。

如图2A所示,使用常规的新ACQUITY BEH Amide色谱柱时,需要进样多达6次才能使OST混合物中所含五种主要 寡核苷酸的UV响应值保持稳定。虽然首次进样时的上样量极高(柱上进样20 pmol OST),但保留性明显较差 ,并且有显著的分析物损失。在后续进样中,分析物和金属表面的相互作用对分离的影响逐渐减少。但是,即使 色谱柱经过充分钝化(例如,6次连续柱上进样20 pmol OST),大分子寡核苷酸(dT25、dT30和dT35)的回收 率仍然不理想。与此相反,5种主要寡核苷酸在ACQUITY Premier BEH Amide色谱柱上的第1次连续进样与后续进 样得到一致的UV响应值,如图2B所示。此外,ACQUITY Premier BEH Amide色谱柱还能够以可重现的方式分离 20种微量寡核苷酸杂质(失败序列),适用于dT3至dT24的寡核苷酸。色谱图的重现性反映了UV响应值的稳定性 ,说明该色谱柱无需色谱柱钝化即可实现分离。MaxPeak HPS层在金属表面和寡核苷酸之间充当屏障,避免寡核 苷酸与表面发生螯合,从而显著降低相互作用。本研究表明,ACQUITY Premier BEH Amide色谱柱可实现高分离 度寡核苷酸分离,无需色谱柱老化,可直接进样。 2A







图2.OST混合物在2.1 x 50 mm色谱柱上首次进样的TUV色谱图: (A)常规不锈钢ACQUITY UPLC BEH Amide色谱柱

(部件号: *1860004800*); (B)ACQUITY Premier BEH Amide色谱柱(部件号: *186009504*)。常规色谱柱需要 充分老化后才能得到稳定的UV信号,而ACQUITY Premier色谱柱则不需要任何老化操作。ACQUITY Premier色谱 柱的色谱分离重现性良好,无需色谱柱老化/钝化处理,即使用于微量杂质也毫不逊色。图2B中分离的寡核苷酸对 应于下列脱氧胸苷失败序列:峰1-*dT3*、2-dT4、3-dT5、4-dT6、5-dT7、6-dT8、7-dT9、8-dT10、9-dT11、 10-dT12、11-dT13、12-dT14、13-dT15(主要成分)、14-*dT16*、15-dT17、16-dT18、17-dT19、18-dT20(主要成分);根据洗脱顺序,峰19-22分别对应*dT21-24*,峰23-25分别对应主要成分*dT25*、dT30和*dT35*。

MassPREP OST标样中5种主要寡核苷酸的HILIC ESI-MS谱图见图3A。相同化合物的IP-RP ESI-MS谱图表现出不 同电荷态的双峰分布³,而HILIC ESI-MS谱图的电荷明显更少,每种寡核苷酸可见3种主要的高丰度电荷态。IP-RP 色谱分离依赖于带正电荷的烷基胺(溶解于高pH值流动相(pH 8-10),以形成强离子对)和带负电荷的寡核苷酸 磷酸盐骨架。这些非共价相互作用不仅对寡核苷酸分离有益且不可或缺(因为烷基胺持续与RP色谱柱的C₁₈疏水链 相互作用),还会影响寡核苷酸结构,如IP-RP色谱法得到的ESI-MS寡核苷酸谱图中的双峰分布所示³。IP-RP色 谱法使OST寡核苷酸部分变性,产生两种电荷态分布:一种包含低电荷态(-3至-5),对应于天然构象;另一种变 性的寡核苷酸构象包含高电荷态(-7至-15)。HILIC分离不需要使用离子对试剂,寡核苷酸保留基于流动相和富 水层之间的分配机制,并且部分固定于固定相上¹³⁻¹⁴。如图3A中的ESI-MS谱图所示,HILIC相互作用似乎可保留 OST的天然状态构象,其中包含数量有限的电荷态(仅3种),所有检出结果均在相对高的质量数范围内(*m/z* = 1000-3000)。对这些大幅精简的ESI-MS谱图(与IP-RP谱图常见的7-12电荷态谱图相对比)进行BayesSpray去 卷积后得到了非常精确的完整分子量测定值,如图3B的处理结果所示。所有主要OST的质量精度均优于15 ppm, 与此前在IP-RP分离中观察到的结果相同³。图3A中的HILIC ESI-MS谱图包含极高水平的钠和钾加合物离子(裸寡 核苷酸信号MS响应值的20%~40%),这表明天然寡核苷酸与流动相中的痕量金属之间可能存在紧密关联。因此 ,HILIC LC-MS分析的灵敏度弱于变性的IP-RP LC-MS分析。

25-mer全硫代磷酸化寡核苷酸(25-mer PS oligo)是1型人体免疫缺陷病毒(HIV-1)的一种候选治疗药物^{15,16},本研 究通过HILIC LC-MS方法,使用与MassPREP OST混标相同的实验条件分析了该物质。相应的ESI-MS谱图见图4 B,仅列出四种电荷态,再次说明该物质呈天然状态寡核苷酸构象。与此HILIC谱图截然不同,图4A中相同化合物 的IP-RP谱图明显"更忙碌",共包含11种电荷态(详细信息见参考资料[3])。然而,在waters_connect软件中 进行数据处理后得到的BayesSpray去卷积谱图表现出良好的质量精度(质量数误差为-4.0 ppm),如图4C中的 屏幕截图所示。要达到这样的质量精度,必须在处理方法中选择硫代磷酸化(PS)寡核苷酸同位素模型,这些方法 专为包含大量硫原子的寡核苷酸类型而设计。



图4.(A) 25-mer PS(全硫代磷酸化)寡核苷酸的IP-RP ESI-MS谱图。插图为waters_connect处理方法中的屏幕截

图,表明电荷去卷积质量数测定结果与预期质量数仅相差1.5 ppm。(B)相同寡核苷酸的HILIC ESI-MS谱图。仅检出4种电荷态,表明该寡核苷酸呈天然状态构象。(C) HILIC ESI-MS谱图的电荷去卷积结果谱图。

IP-RP与HILIC ESI-MS谱图的电荷态差异在大分子寡核苷酸中仍然可见。通过IP-RP色谱法分析57-mer寡核苷酸可 得到多种电荷态(13种)(见图5A),而通过HILIC色谱法分析仅产生3种完全不同的电荷分布(见图5B)。即使 HILIC ESI-MS谱图用于去卷积的电荷态较少,但在waters_connect中进行BayesSpray处理后仍可得到与IP-RP ESI-MS谱图相似的结果:质量数误差10.2 ppm vs 13.7 ppm。两种方法的完整分子量测量的质量精度均优于15 ppm。

IP-RP vs HILIC模式除了ESI-MS谱图的电荷态差异以外,新的色谱分离技术在寡核苷酸完整分子量确认的LC-MS 分析成本方面也有一定优势。假设制备相同体积的流动相,IP-RP LC-MS流动相的成本通常是HILIC流动相的10倍 左右。这主要是因为LC-MS级HFIP的成本高昂,这是一种具有较强毒性的改性剂,用于增加寡核苷酸的质谱响应 值。HILIC流动相不需要该改性剂,因此可以避免引入IP-RP流动相相关的毒性,使该分离模式更具吸引力。此外 ,使用IP-RP法分析寡核苷酸时,LC-MS信号在流动相制备后24小时开始减弱,因此需要频繁制备小体积流动相 (每天200~500 mL)¹⁷。然而,UV寡核苷酸信号的稳定性不受影响,因此对于仅使用光学检测的应用而言,不 需要每天制备流动相。我们通过每天使用MS和UV检测器监测dT15寡核苷酸的峰面积,研究了HILIC方法分离寡核 苷酸的ESI-MS信号稳定性。我们针对HILIC流动相的洗脱液A和B制备了两份大体积(1 L)流动相,并且在2周(14天)内每天重复进样(n=3)10 μM OST样品。我们根据OST混合物中dT15寡核苷酸三电荷单同位素质量数(*m/z* = 1498.57处的[M-3H]⁻³)的提取质谱图,通过峰面积监测ESI-MS信号。将此面积与相同寡核苷酸在260 nm处UV色 谱图的峰面积比较,并将每次进样得到的MS vs UV峰面积相除,得到MS vs UV信号比。如图6中的峰面积比所示 ,2周内的响应值保持高度一致。此图清楚表明,HILIC流动相在本研究的时间周期内保持稳定,HILIC LC-MS分析 相比IP-RP分析更具优势:HILIC LC-MS分析寡核苷酸无需频繁制备流动相。 5A





图5.57-mer寡核苷酸的ESI-MS谱图: (A) IP-RP ESI-MS谱图,显示宽分布电荷态; (B) HILIC-ESI MS谱图,仅显示 IP-RP色谱法无法检出的3种独特电荷态。每种分析组合的插图突出显示了BayesSpray电荷去卷积处理后的质量数

11



图6.*HILIC*流动相在2周实验期间的稳定性趋势图。此曲线反映了*ESI-MS vs UV*模式每天的*dT15*寡核苷酸响应峰面积比。对于*MS*响应值,使用三电荷单同位素质量数(*m/z* = 1498.57处的[*M-3H*]⁻³)的提取质谱图,对于*UV*峰面积测量值,使用260 *nm*处的*TUV*响应值。

结论

- waters_connect工作流程经证明能够提供良好的质量精度(低于15 ppm),适合使用HILIC LC-MS分析进行 寡核苷酸完整分子量确认
- 采用MaxPeak高性能表面的ACQUITY Premier BEH Amide色谱柱可以分析多达20种微量杂质,无需色谱柱钝化,且灵敏度和重现性均有提升

- HILIC LC-MS分析的优势主要集中在流动相组成方面: HILIC流动相与IP-RP流动相相比毒性低、成本低, LC-MS稳定性更佳。
- 本研究开发的HILIC LC-MS分析方法可视作寡核苷酸完整分子量分析的可行替代方法。

参考资料

- 1. Vivek K Sharma, Jonathan K Watts.Oligonucleotide Therapeutics: Chemistry, Delivery and Clinical Progress, *Future Med Chem*, 2015, 7(16), 2221–2242.
- 2. Roberts TK, Langer R, Wood MJA Advances in Oligonucleotide Drug Delivery, *Nat Reviews*, 2020, 19, 673–694.
- 3. Catalin E. Doneanu, Jonathan Fox, Emma Harry, Chris Knowles, Ying Qing Yu, Joseph Fredette, Weibin Chen.利用符合法规要求的自动化LC-MS工作流程对聚核苷酸进行完整质量数确认和纯度分析, 沃特世应用纪要, 720006820ZH, 2020.
- 4. Catalin E. Doneanu, Jonathan Fox, Emma Harry, Chris Knowles, Ying Qing Yu, Joseph Fredette, Weibin Chen.使用BioAccord LC-MS系统对各种经过大量修饰的寡核苷酸进行完整质量数确认分析, 沃特世应用纪要, 720007028ZH, 2020.
- 5. Goyon A, Yehl P, Zhang K Characterization of Therapeutic Oligonucleotides by Liquid Chromatography, *J Pharm Biomed Analysis*, 2020, 182, 1–17.
- Sutton JM, Guimaraes GJ, Annavarapu V, van Dongen WD, Bartlett MG Current State of Oligonucleotide Characterization Using Liquid Chromatography-Mass Spectrometry: Insight into Critical Issues, JASMS, 2020, 31, 1775–1882.
- Lobue PA, Jota M, Addepalli B, Limbach PA Oligonucleotide Analysis by Hydrophilic Interaction Chromatography-Mass spectrometry in The Absence of Ion-Pair Reagents, *J Chrom A*, 2019, 1595, 39–48.
- 8. M. Lauber, T. H. Walter, M. Gilar, M. DeLano, C. Boissel, K. Smith, R. Birdsall, P. Rainville, J. Belanger,

K. Wyndham.Low adsorption HPLC Columns Based on MaxPeak High Performances Surfaces, Waters White Paper, 720006930EN https://www.waters.com/webassets/cms/library/docs/720006930en.pdf > , 2020.

- DeLano M, Walter TH, Lauber MA, Gilar M, Jung MC, Nguyen J, Boissel C, Patel AV, Bates-Harrison A, Wyndham K Using Hybrid Organic-Inorganic Surface Technology to Mitigate Analyte Interactions With Metal Surfaces in UHPLC, *Anal Chem*, 2021, 93, 5773–5781.
- 10. Gilar M, DeLano M, Gritti F Mitigation of Analyte Interactions With Metal Surfaces in UHPLC, *J Chrom A* 2021, 1650, 462247.
- 11. Kathryn Brennan, Mary Trudeau, Paul D. Rainville, 利用ACQUITY Premier系统和色谱柱改善 寡核苷酸生物分析的色谱性能, 沃特世应用纪要, 720007119ZH,2021.
- 12. Brooke M. Koshel, Robert E. Birdsall, Ying Qing Yu.Improving Recovery and Quantitation of Oligonucleotide Impurities Using the ACQUITY Premier with MaxPeak HPS Technology, Waters application Note, 720007238EN, 2021.
- 13. Alpert AJ Hydrophilic-Interaction Chromatography for the Separation of Peptides, Nucleic Acids and Other Polar Compounds, *J Chrom* 1990, 499, 176–196.
- 14. Hemstrom P, Irgum K, Hydrophilic Interaction Chromatography, J Sep Sci 1990, 499, 176–196.
- 15. Gilar M, Belenky A, Smisek DL, Bourque A, Cohen AS Kinetics of Phosphorothioate Oligonucleotide Metabolism in Biological Fluids, *Nucleic Acids Res*, 1997, 25, 3615–3620.
- 16. Zhang R, Diasio RB, Lu Z, Liu T, Jiang Z, Galbraith WM, Agrawal S Pharmacokinetics and Tissue Distribution in Rats of an Oligodeoxynucleotide (GEM 91) Developed as a Therapeutic Agent for Human Immunodeficiency Virus TYPE-1, *Biochem Pharmacol*, 1995, 49, 929–939.
- Birdsall R, Gilar M, Shion H, Yu YQ, Chen W Reduction of Metal Adducts in Oligonucleotide Mass Spectra in Ion-Pair Reversed-Phase Chromatography/Mass Spectrometry, *Rapid Comm Mass Spectrom*, 2016, 14, 1667–1679.

特色产品

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

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

UNIFI科学信息系统 < https://www.waters.com/134801648>

waters_connect <https://www.waters.com/waters/nav.htm?cid=135040165>

720007395ZH,2021年12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		546号-2	京公网	安备 3101150	2007476号		