

利用MaxPeak™高性能表面技术(HPS)提高硫代磷酸寡核苷酸在多维液相色谱中的回收率

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

Waters Corporation

这是一份应用简报，不包含详细的实验部分。

摘要

使用不锈钢或其他合金设计的液相色谱(LC)系统和色谱柱硬件会发生非特异性吸附，导致分析金属敏感分析物的性能降低。峰形畸变、回收率偏低和数据解析的差异性偏高都会导致性能下降。采用MaxPeak HPS技术的ACQUITY™ Premier色谱柱和系统能够大幅减少分析物与表面的相互作用，经证明可以提高灵敏度，因此有助于更可靠的定量许多原本难以分析的分析物。尽管这些优势在生物制药领域的众多分析物（如肽、游离寡糖和寡核苷酸）中都有所体现，但现有文献的研究热点还是传统的一维分离技术。本项概念验证研究将分析方法扩展到多维分离空间，为了展示MaxPeak Premier解决方案对此可以提供的优势，使用两种不同的分析物进行了评估。

优势

- Premier与非Premier MDLC平台对非金属敏感分析物的性能一致
- 金属敏感分析物在ACQUITY Premier多维系统第一维和第二维之间的回收率保持不变

简介

研究表明，采用MaxPeak高性能表面(HPS)技术的ACQUITY Premier色谱柱和系统可以提高含有富电子官能团的分析物的数据质量，这些分析物对金属表面具有高亲和力，通常情况下难以分析。许多传统的LC系统和色谱柱硬件都采用不锈钢或其他合金制成，而MaxPeak HPS技术能在分析物和金属表面之间建立一层有机/无机屏障，目的是减少非特异性吸附。虽然这项技术已被证明在许多不同的分析物和应用领域都具有优势，但现有文献的研究热点主要还是一维(1D)分析方法。鉴于MaxPeak Premier解决方案的已知优势，我们有理由相信，如果将其扩展到多维液相色谱(MDLC)中，与传统色谱柱和系统相比，性能会得到进一步提升。

本研究比较了两种MDLC配置：第一套系统采用MP35N（一种镍钴合金），第二套系统采用MaxPeak HPS技术。概念验证RPLC - 设计RPLC实验，使1D和2D运行相同的反相分离，以便在单个系统内以及仪器平台之间轻松比较峰面积。首先使用非金属敏感分析物确认两个MDLC平台之间的结果相似，然后使用金属敏感分析物进行评估，证明在使用不锈钢色谱柱和具有金属流路的MDLC系统无法回收分析物的情况下，使用MaxPeak HPS技术使回收率大幅提升。



ACQUITY Premier多维系统

结果与讨论

本研究配置了两套MDLC系统，其中一套系统采用MP35N（搭载2D技术的ACQUITY UPLC™ H-Class PLUS Bio系统），另一套系统采用MaxPeak HPS技术（ACQUITY Premier多维系统）。两套系统使用相同的液相色谱组件：第一维使用QSM，第二维使用BSM，且第一维和第二维均串联有光学检测器。为使第一维和第二维运行相同的反相分离，使用单中心切割功能将目标分析物转移到第二维，并使用柱头稀释(ACD)功能来稀释1D洗脱所需的高有机溶剂含量，使分析物重新聚焦在2D色谱柱的头部。ACQUITY UPLC BEH™ C₁₈不锈钢色谱柱, 130 Å, 1.7 μm, 2.1 x 50 mm（部件号：[186002350 <https://www.waters.com/nextgen/global/shop/columns/186002350-acquity-uplc-beh-c18-column-130a-17--m-21-mm-x-50-mm-1-pk.html>](https://www.waters.com/nextgen/global/shop/columns/186002350-acquity-uplc-beh-c18-column-130a-17--m-21-mm-x-50-mm-1-pk.html)）与搭载2D技术的ACQUITY UPLC H-Class PLUS Bio系统联用；ACQUITY Premier BEH C₁₈寡核苷酸分析专用柱, 130 Å, 1.7 μm, 2.1 x 50 mm（部件号：[186009484 <https://www.waters.com/nextgen/global/shop/columns/186009484-acquity-premier-oligonucleotide-c18-column-130a-17--m-21-x-50-mm.html>](https://www.waters.com/nextgen/global/shop/columns/186009484-acquity-premier-oligonucleotide-c18-column-130a-17--m-21-x-50-mm.html)）与ACQUITY™ Premier多维系统联用。所有色谱柱在用于MDLC研究之前都经过高上样量的钝化处理。使用同一仪器设置来评估非金属敏感分析物（磺胺二甲氧嘧啶）和金属敏感分析物（全硫代反义寡核苷酸，Gem 91）的回收率。

首先使用磺胺二甲氧嘧啶确认两套MDLC系统在常规条件下具有相似的性能。由于磺胺二甲氧嘧啶对金属表面的亲和力不高，因此预计同一系统不同维度之间以及两个不同仪器平台之间的分析物回收率（或峰面积）应相同。将含有1 mg/mL磺胺二甲氧嘧啶乙腈溶液的混标（ACQUITY/Quattro micro或Quattro Premier MS启动溶液套件，部件号：[700002741 <https://www.waters.com/nextgen/global/shop/standards--reagents/700002741-acquity---quattro-micro-or-quattro-premier-ms-start-up-solution-.html>](https://www.waters.com/nextgen/global/shop/standards--reagents/700002741-acquity---quattro-micro-or-quattro-premier-ms-start-up-solution-.html)）用水稀释至0.01、0.001和0.0001 mg/mL。图1所示为每套MDLC系统第一维和第二维中三次重复进样系列的TUV峰面积。每套系统中峰面积均可重复，表明即使在低浓度下，因非特异性吸附造成的分析物损失也可以忽略不计。此外，不同仪器平台报告的峰面积值相当，并且都在独立分离的标准偏差范围内。

非金属敏感分析物的回收率

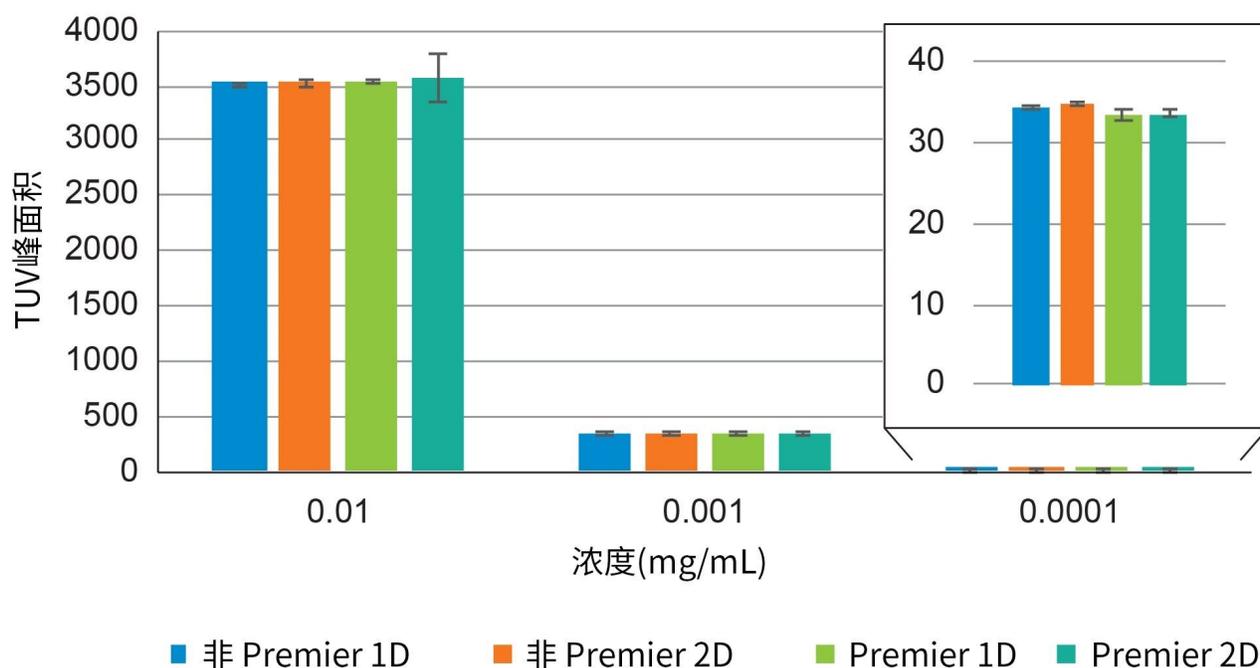


图1.2D的磺胺二甲氧嘧啶（非金属敏感分析物）回收率(N=3)。第一维运行的反相梯度为，流动相B在五分钟内从5%升至95%，其中MPA为含0.1%甲酸(v/v)的水溶液，MPB为含0.1%甲酸(v/v)的乙腈溶液。使用中心切割功能将磺胺二甲氧嘧啶转移到第二维，并在这里使用ACD功能(100% MPA)降低洗脱所需的有机溶剂百分比。然后在第二维分离中使用相同的反相梯度。

确认各MDLC系统的性能相似后，使用Gem 91的三次重复进样系列进一步评估回收率。既往研究曾使用1D分析方法评估回收率，所得结果表明MaxPeak HPS技术可以提高回收率并扩展Gem 91的动态范围¹。利用这一先验知识，我们使用Gem 91（10.4 pmol、1.04 pmol和0.104 pmol）的三点稀释系列来说明MaxPeak Premier解决方案对金属敏感分析物的优势（图2）。首先在1D分析Gem 91稀释系列，此时不锈钢色谱柱和MP35N MDLC系统获得的峰面积与MaxPeak Premier解决方案相比减少了25%（10.4 pmol）和75%（1.04 pmol）。在所评估的最低浓度下，如果不使用MaxPeak HPS技术，根本无法检出Gem 91。分析2D峰面积时，在不锈钢色谱柱和MP35N MDLC系统中，第一维和第二维之间因非特异性吸附而损失了大约70%的分析物。而在MaxPeak Premier系统中，无论上样量多少，第一维和第二维之间的样品损失都可以忽略不计。

金属敏感分析物的回收率

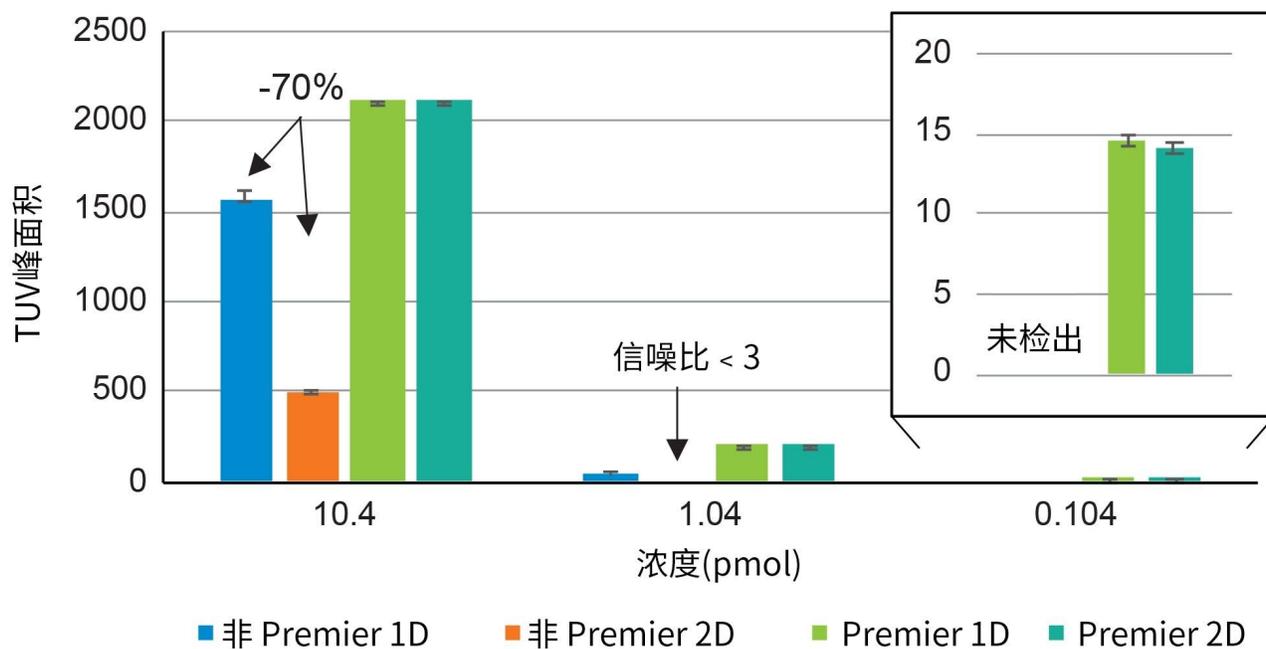


图2.2D的Gem 91 (金属敏感分析物) 回收率(N=3)。第一维中运行的反相梯度为, 流动相B在十分钟内从30%升至40%, 其中流动相A为8.6 mM TEA、100 mM HFIP, pH约8.25, 流动相B为50-50流动相A的甲醇溶液。使用中心切割功能将Gem 91转移到第二维, 并在这里使用ACD功能(100% MPA)降低洗脱所需的有机溶剂百分比。然后在第二维分离中使用相同的反相梯度。

结论

MDLC在整个生物制药行业皆有运用, 对于需要更高的选择性、速度或灵敏度而1D却无法应用来说是一种不错的选择。MaxPeak HPS技术的决定性优势已扩展到MDLC, 使用不锈钢色谱柱和具有金属流路的MDLC系统会加剧非特异性吸附导致的分析物损失, 采用此技术可以提高MDLC的回收率。MaxPeak HPS技术可有效减少分析物与表面的相互作用, 使金属敏感分析物在1D和2D分析之间的峰面积保持不变, 同时保持非金属敏感分析物的性能。

参考资料

1. Koshel BM, Birdsall RE, Yu YQ. Improving Recovery and Quantitation of Oligonucleotide Impurities Using ACQUITY Premier with MaxPeak HPS Technology. Waters Application Note [720007238](#). April 2021.

特色产品

搭载多维技术的ACQUITY Premier系统 <

<https://www.waters.com/waters/global/nav.htm?cid=135093306>>

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>>

720007602ZH, 2022年4月

© 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