

使用MaxPeak高性能表面技术改善寡核苷酸的SPE-LC-MS分析性能

Kathryn Brennan, Mary Trudeau, Michael Donegan, Paul D. Rainville

Waters Corporation

摘要

为支持新一代寡核苷酸药物的研发，科研人员对高选择性、高灵敏度LC-MS生物分析方法的需求大幅增加。本文所述研究使用SPE、RP-UPLC、亚2- μm ACQUITY Premier C₁₈寡核苷酸分析专用柱以及串联四极杆质谱仪检测并定量寡聚脱氧胸苷和全硫代磷酸化寡核苷酸反义药物GEM91（图1）。

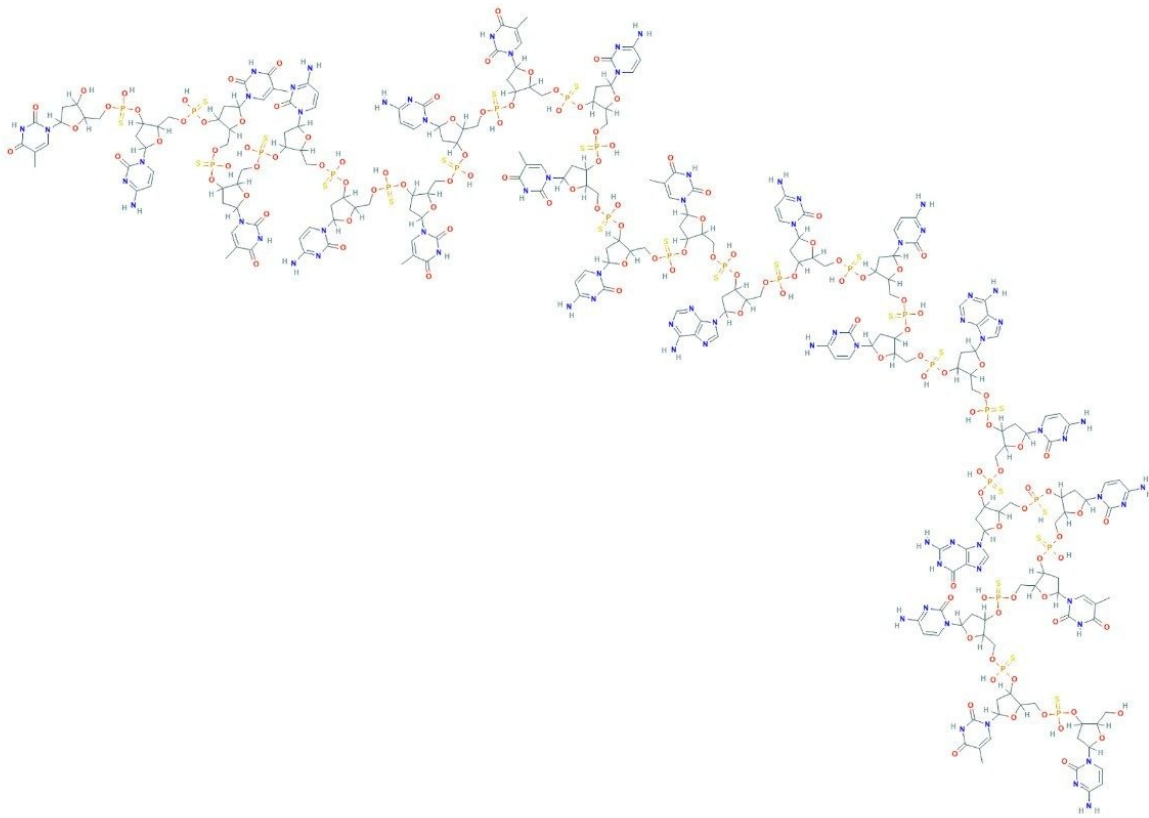


图1.GEM91（曲可韦生）寡核苷酸结构¹

优势

- ACQUITY Premier C₁₈亚2 μm寡核苷酸分析专用柱可以提高寡核苷酸的色谱回收率，改善LLOQ，并缩短色谱柱钝化时间。
- 研究人员开发出一种简单的样品前处理方法和UPLC-MS/MS分析方法用于检测并定量寡聚脱氧胸苷和GEM91（硫代磷酸化反义寡核苷酸）。
- 开发出一种选择性RP和混合模式SPE提取方法，实现了较高的寡核苷酸回收率。
- 使用μElution 96孔SPE提取板，无需蒸发样品，减少因吸附引起的寡核苷酸损失。
- 在样品分析前后使用Waters MassPREP OST标准品进行系统适应性检查，确保系统的整体健康状况和性能。
- 经LLE-Oasis WAX SPE提取处理后，GEM91的定量限为50 ng/mL，LOD≤2.5 ng/mL。

简介

随着新一代寡核苷酸药物(ONT)的靶向特异性和稳定性不断提高,近年来为支持此类药物的研发,科研人员对LC-MS生物分析方法的需求大幅增加。由于ONT的尺寸、理化特性各异、聚阴离子性质以及蛋白质和非特异性结合(NSB)等已知问题,开发稳定耐用、高灵敏度、高选择性的样品前处理方法和LC-MS分析方法一直以来都十分具有挑战性。此外,由于电离/碎裂有限、RP色谱保留不佳以及需要与内源性基质干扰物质分离,获得LC-MS灵敏度和选择性仍然是一项挑战。

本文所述研究提供了一种对不同寡核苷酸(15-35T)进行提取和定量的分析方法。使用反相(RP)和混合模式离子交换 μ Elution固相萃取(SPE)进行样品前处理,可提供较高的寡核苷酸回收率。RP UPLC色谱分离采用新型亚2 μ m ACQUITY Premier色谱柱,能够对寡核苷酸进行快速分析、回收并获得高分离度。ACQUITY Premier色谱柱专为防止分析物非特异性吸附而设计,可大幅减少离子型分析物/表面相互作用,显著提高寡核苷酸分析物的回收率。所开发的SPE-LC-MS(ACQUITY UPLC I-Class PLUS系统与Xevo TQ-XS串联四极杆质谱仪联用)方法可实现高回收率、选择性和灵敏度,使纯样品和提取样品的定量下限(LLOQ)低至ng/mL级。

实验

寡核苷酸SPE方法开发

使用不含蛋白酶(核糖核酸酶)的水配制各种浓度的Waters MassPREP OST标准品(15-35T; 部件号: 186004135 <<https://www.waters.com/nextgen/in/en/shop/standards--reagents/186004135-massprep-oligonucleotide-standard.html>>)和寡聚脱氧核苷酸硫代磷酸酯(GEM91)溶液。将100 μ L不含核糖核酸酶的水加入样品瓶中,然后混合,制得50 nmol/mL的Waters MassPrep OST 5 nmol标准品(OST标准品)浓缩储备液。使用不含核糖核酸酶的水配制GEM91(2.50 mg/mL)和GEM132(4.00 mg/mL)的浓缩储备液。使用GEM132作为内标(IS)。在SPE方法开发和最终分析过程中,使用OST标准品(50 nmol/mL)和GEM91(500 μ g/mL)的工作储备液配制各种寡核苷酸样品。图2A和2B分别展示了使用Waters Oasis HLB和WAX μ Elution 96孔SPE提取板的不同SPE方案。所有SPE步骤均使用沃特世正压萃取装置进行。

寡核苷酸SPE和LC-MS/MS定量分析

校准品和质控(QC)样品: 要制备校准品和质控样品,将OST标准品和GEM91工作储备液按0.0025-50

nmol/mL (OST标准品) 和0.005–100 µg/mL (GEM91)的不同浓度加入水或市售血浆/血清中。将GEM132 IS溶液加入制得的各样品中。最终IS浓度为20 µg/mL。人血浆 (已使用乙二胺四乙酸(K2EDTA)处理, 未去除激素) 购自BIOIVT (纽约)。

样品提取

纯标准样品:

在50 mM乙酸铵缓冲液(pH 5.5)中制备样品。使用Waters Oasis WAX µElution 96孔SPE提取板 (部件号: [186002500 <https://www.waters.com/waters/partDetail.htm?partNumber=186002500>](https://www.waters.com/waters/partDetail.htm?partNumber=186002500)) 提取制得的样品, 提取方案如图2C所示。由于无需破坏蛋白结合, 因此省略了添加均质化缓冲液的步骤。

血浆样品:

执行两步萃取法: 先使用苯酚-氯仿进行液液萃取(LLE), 再使用Oasis WAX SPE提取所得的血浆上清液。为此, 将制得的400 µL血浆样品等分试样用1000 µL变性/裂解缓冲液稀释, 然后涡旋混合。随后加入200 µL苯酚:氯仿:异戊醇(25:24:1)等分试样。将样品涡旋混合30 min, 然后在14,000 RPM下离心10 min。将LLE上清液的最上层(2 × 650 µL)上样至经过老化和平衡的Oasis WAX SPE提取板, 使用图2C所示的优化方案进行提取。

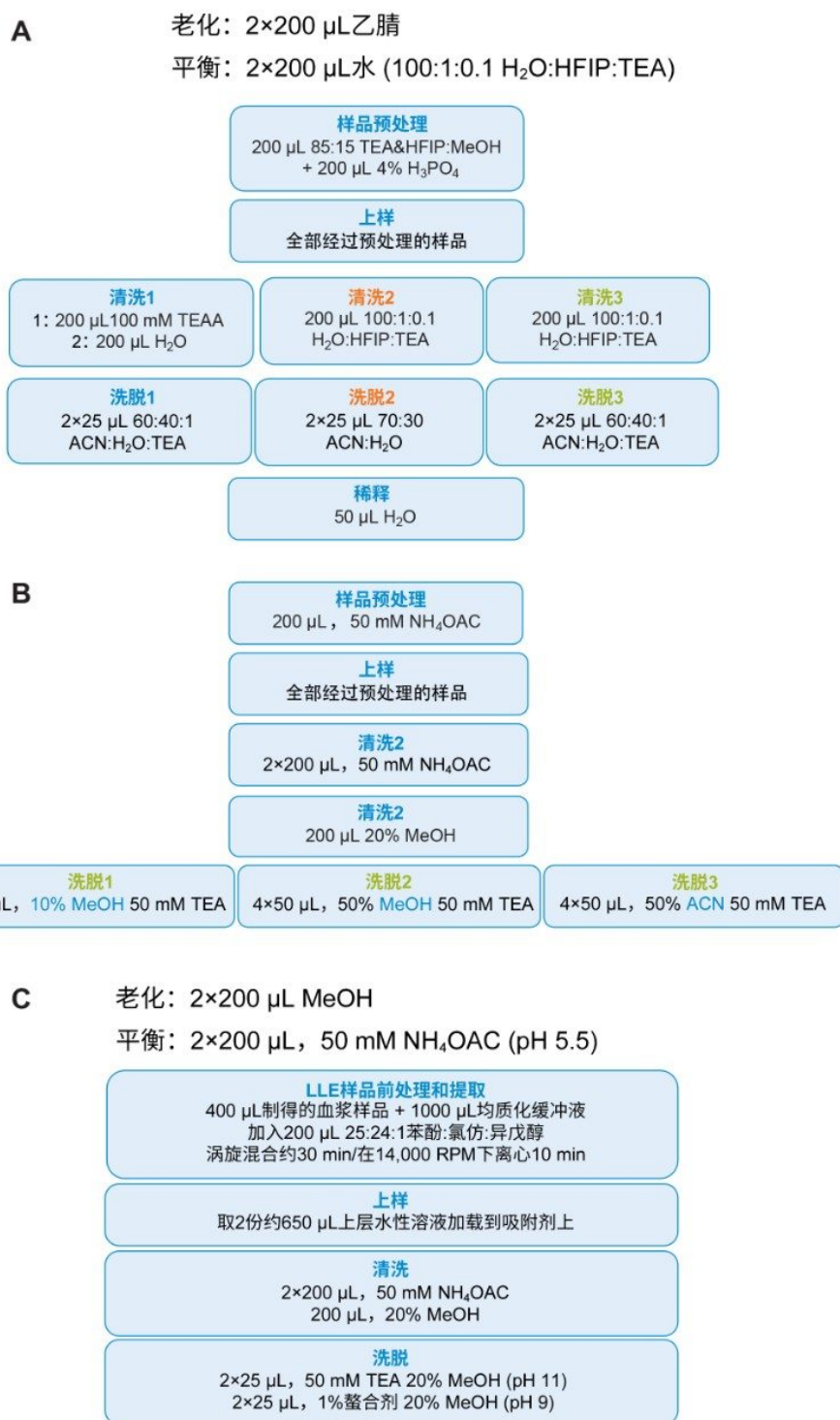


图2.SPE样品前处理和纯化方案：(A) Oasis HLB、(B) Oasis WAX和(C)最终优化的LLE-Oasis WAX SPE。所有SPE

均使用 μ Elution 96孔板进行。

液相色谱条件

系统:	使用单个柱温箱的ACQUITY UPLC I-Class (FTN)
检测:	MS
样品瓶/样品板:	采用MaxPeak技术的 QuanRecovery 700 μ L样品板 (部件号: 186009185), 带 圆形聚丙烯盖垫 (部件号 : 186002483)
色谱柱:	AQUITY Premier C ₁₈ 寡核苷酸 分析专用柱 1.7 μ m, 2.1 x 50 mm (部件号: 186009484)
柱温:	50 °C
样品温度:	8 °C
进样体积:	20 μ L
流速:	0.6 mL/min
流动相A:	含150 mM六氟异丙醇(HFIP)和 5 mM己胺(HA)的水溶液
流动相B:	含150 mM HFIP和5 mM HA的 甲醇溶液

清除溶剂： 90:10水:甲醇

清洗溶剂： 90:10水:甲醇

梯度

时间 (min)	流速 (mL/min)	%A	%B	曲线
初始	0.6	90	10	6
1.0	0.6	90	10	6
1.5	0.6	50	50	6
3.0	0.6	45	55	6
3.5	0.6	40	60	6
4.0	0.6	30	70	6
4.1	0.6	5	95	6
4.5	0.6	5	95	6
4.6	0.6	90	10	6
5.0	0.6	90	10	6

质谱条件

系统： Xevo TQ-XS串联四极杆

电离模式： ESI-

采集范围： MRM

毛细管电压： 2.00 kV

脱溶剂气温度： 500 °C

脱溶剂气流速： 1000 L/h

锥孔气流速: 150 L/h

碰撞气体流速: 0.2 mL/min

喷雾器气流: 7 bar

碰撞能量: 见表1

锥孔电压: 见表1

化合物	电荷	母离子 (<i>m/z</i>)	子离子	碰撞能量 (eV)	锥孔电压 (V)
15T	(-4)	1123.8	302.8	40	40
			382.6	40	40
			606.8	40	40
20T	(-4)	1504.2	303.2	45	40
			382.9	45	40
			607.2	45	40
25T	(-4)	1884.7	302.6	50	40
			382.8	50	40
			624.7	45	40
			929.4	40	40
30T	(-5)	1811.5	302.5	45	40
			382.8	45	40
			606.7	45	40
			928.4	45	40
35T	(-6)	1762.9	302.7	50	40
			383.1	50	40
			624.5	50	40
			705.1	50	40
GEM 91	(-5)	1553.7	512.8	30	40
			722.0	30	40
GEM 132	(-5)	1319.2	94.5	40	40
			357.3	40	40
			807.6	25	40

表1.寡核苷酸分析所用的最终MS条件

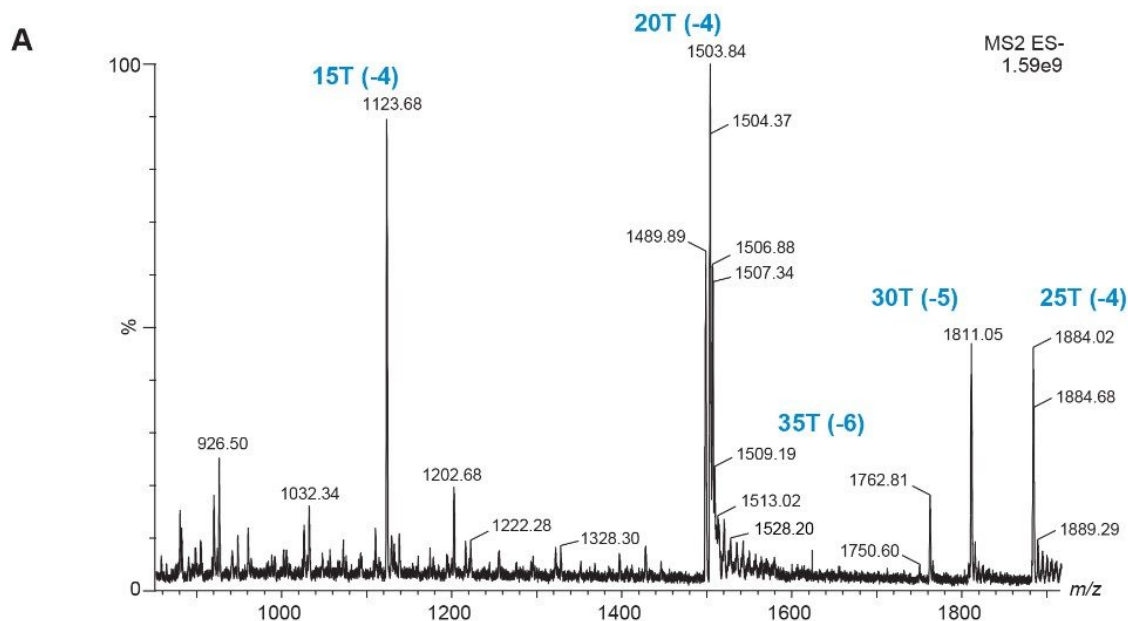
数据管理

仪器控制软件: MassLynx 4.2版

定量软件: TargetLynx

结果与讨论

在15T、20T、25T、30T和35T OST标准品中观察到数种多电荷母离子。所有OST mer、GEM91和GEM132均获得了全扫描MS和MS/MS谱图（数据未显示）。代表性全扫描质谱图见图3A，其中展示了OST MassPREP标准品(15–35T)的主要母离子电荷态。图3B展示了OST 35 mer中丰度最高的-6和-12母离子电荷态的代表性MS/MS谱图。OST 15–35 mer、GEM91和GEM132检测与定量分析所用的最终MRM母子离子对见表1。与大多数大分子生物制剂一样，分析物产生了许多碎片，强度最高的碎片存在于 m/z 200以下。低质量数 m/z 碎片由于缺乏特异性，通常导致提取样品的背景较高。本分析利用 m/z 高于200的高特异性离子碎片显著提高了特异性，便于使用更简单的LC和SPE方法。



B
质量数-6和-12电荷态

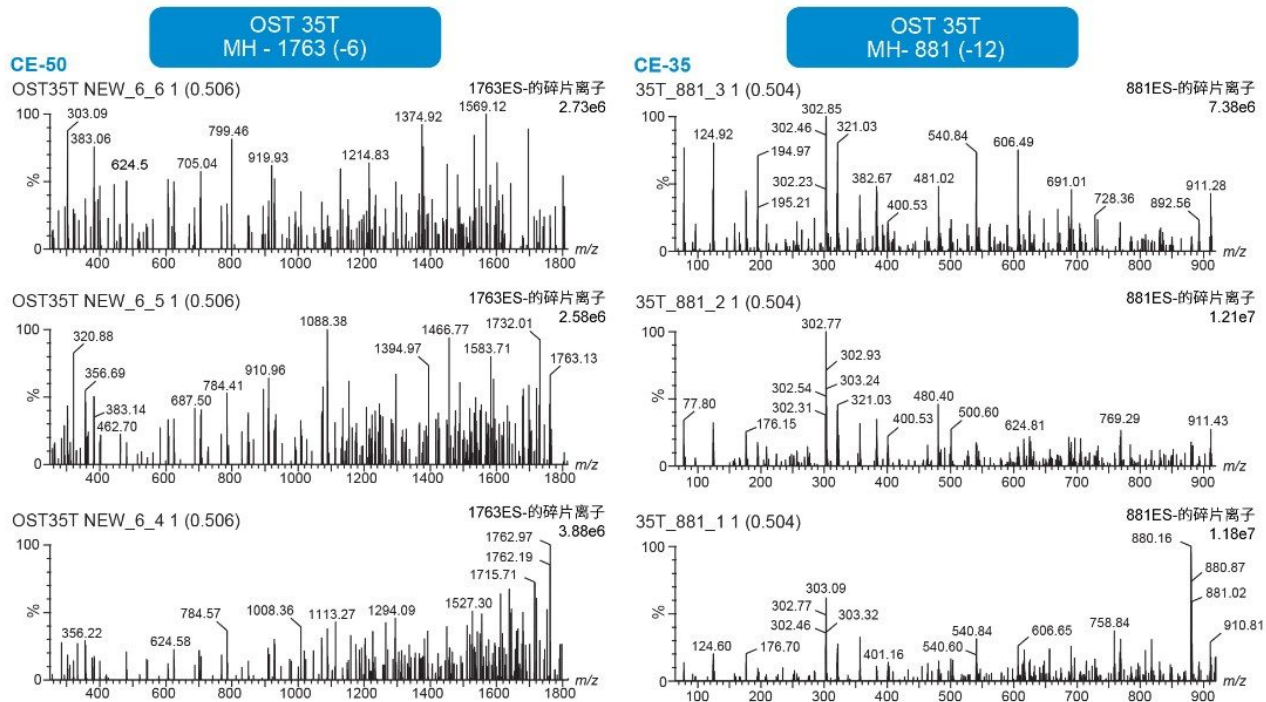


图3. Waters MassPREP OST标准品的代表性MS全扫描和子离子谱图(PIS)。A图突出显示了OST 15 mer、20 mer、

25 mer、30 mer和35 mer的主要母离子；B图展示了OST标准品35 mer及其主要-6和-12母离子电荷态的代表性PIS谱图。

本研究选择新型ACQUITY Premier C₁₈寡核苷酸分析专用柱进行分析。该色谱柱填充有1.7 μm杂化硅胶颗粒，非常适合在中性至中等碱性pH条件和高温下进行分离，满足寡核苷酸的保留和充分分离要求。ACQUITY Premier色谱柱在硬件上采用了MaxPeak高性能表面(HPS)技术，这对于改善寡核苷酸回收率和分析检测限至关重要。HPS技术专为尽量减少金属表面与分析物（例如寡核苷酸、磷酸肽、小分子有机磷酸酯及其他曾对金属表面表现出很强亲和力的分析物）之间的相互作用而开发。使用实验部分所述的LC条件，使OST、GEM91和GEM132获得了窄峰。OST标准品(15-35T)的分离结果如图4A所示，GEM91和GEM132 (IS)的分离结果如图4B所示。ACQUITY Premier C₁₈寡核苷酸分析专用柱具有开箱即用的性能，图5分别使用OST 20 mer (A)和GEM91 (B)展示了该色谱柱与标准ACQUITY UPLC BEH C₁₈寡核苷酸分析专用柱相比，在寡核苷酸分析物回收率方面的提升。除寡核苷酸回收率有所提升外，MaxPeak Premier色谱柱对于使用寡核苷酸标准品进行钝化的需求也大幅降低（数据未显示）。从而明显延长了仪器分析正常运行时间，并节省了昂贵的流动相试剂。

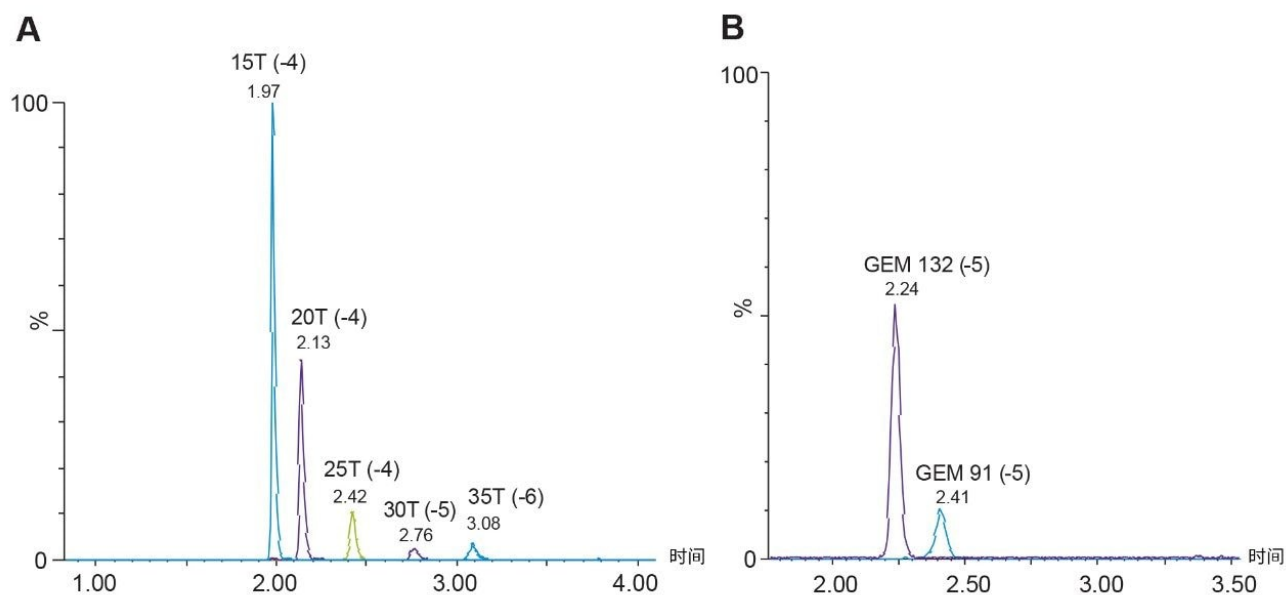


图4.使用ACQUITY Premier C₁₈寡核苷酸分析专用柱(1.7 μm, 2.1×50 mm)和实验部分所述的LC条件得到的(A) MassPREP OST 15-35 mer以及(B)全硫代磷酸化寡核苷酸GEM91和GEM132的UPLC色谱分离结果。

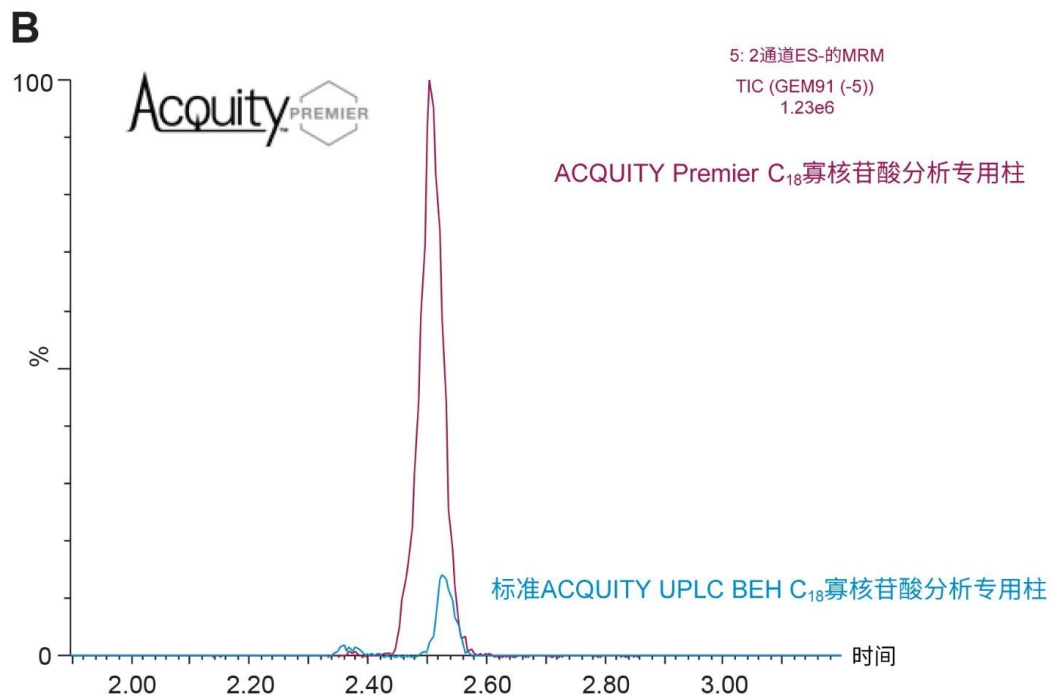
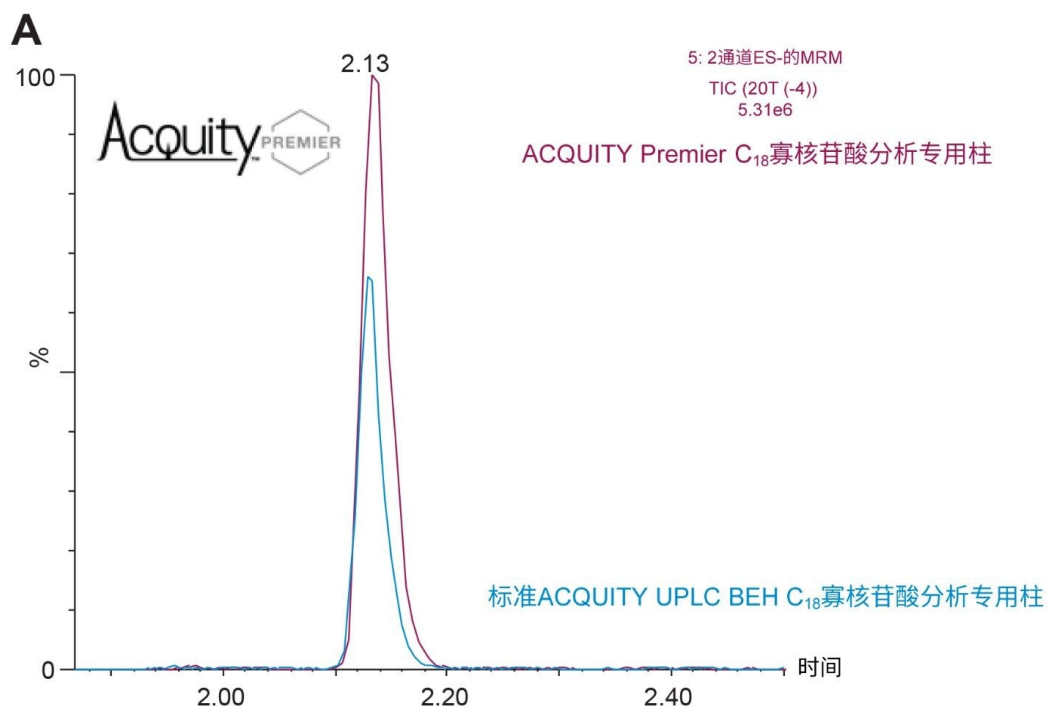


图5.ACQUITY Premier C₁₈寡核苷酸分析专用柱与ACQUITY UPLC BEH C₁₈寡核苷酸分析专用柱相比，对(A) Waters

MassPREP OST标准品20 mer和(B) GEM91展现出更高的“开箱即用”（进样2）色谱性能（寡聚核苷酸回收率）。

在样品前处理方法开发过程中，发现寡核苷酸回收率和重现性不佳的问题与非特异性吸附、蛋白结合和溶解度有关，这是大多数大分子的常见问题。仔细全面地系统性评估各种预处理选项以及清洗和洗脱SPE解决方案，对于提高方法的SPE回收率和特异性至关重要。样品前处理方法开发过程中所用的SPE方案如图2所示，其中分别展示了Waters Oasis HLB (A)和WAX (B)吸附剂的SPE方案。每种方案均使用纯溶液标准品评估寡核苷酸回收率。筛选的各种SPE条件为上样、清洗和洗脱步骤。图6A (HLB)和6B (WAX)突出显示了寡核苷酸的SPE回收率结果。对于Oasis HLB和WAX吸附剂，在所有方案（HLB和WAX）下，SPE回收率通常随寡核苷酸大小增加而降低。当使用TEA:HFIP:MeOH溶液进行样品预处理，然后用H₃PO₄吸附剂稀释，再用H₂O:HFIP:TEA溶液清洗，随后用ACN:H₂O:TEA溶液洗脱时，可实现出色的总体HLB SPE回收率。由于具有强阴离子性质，混合模式SPE（包含RP和阴离子交换分离）是寡核苷酸纯化的理想选择。除提供足够高的回收率以外，使用Oasis WAX SPE通常可以提高选择性，从而在SPE纯化过程中洗出中性干扰物。由于LC分离采用反相方法进行，因此也为整个分析提供了正交优势。当洗脱溶液含有50 mM TEA和50% ACN或MeOH的组合时，使用Oasis WAX SPE可获得出色的总体回收率。

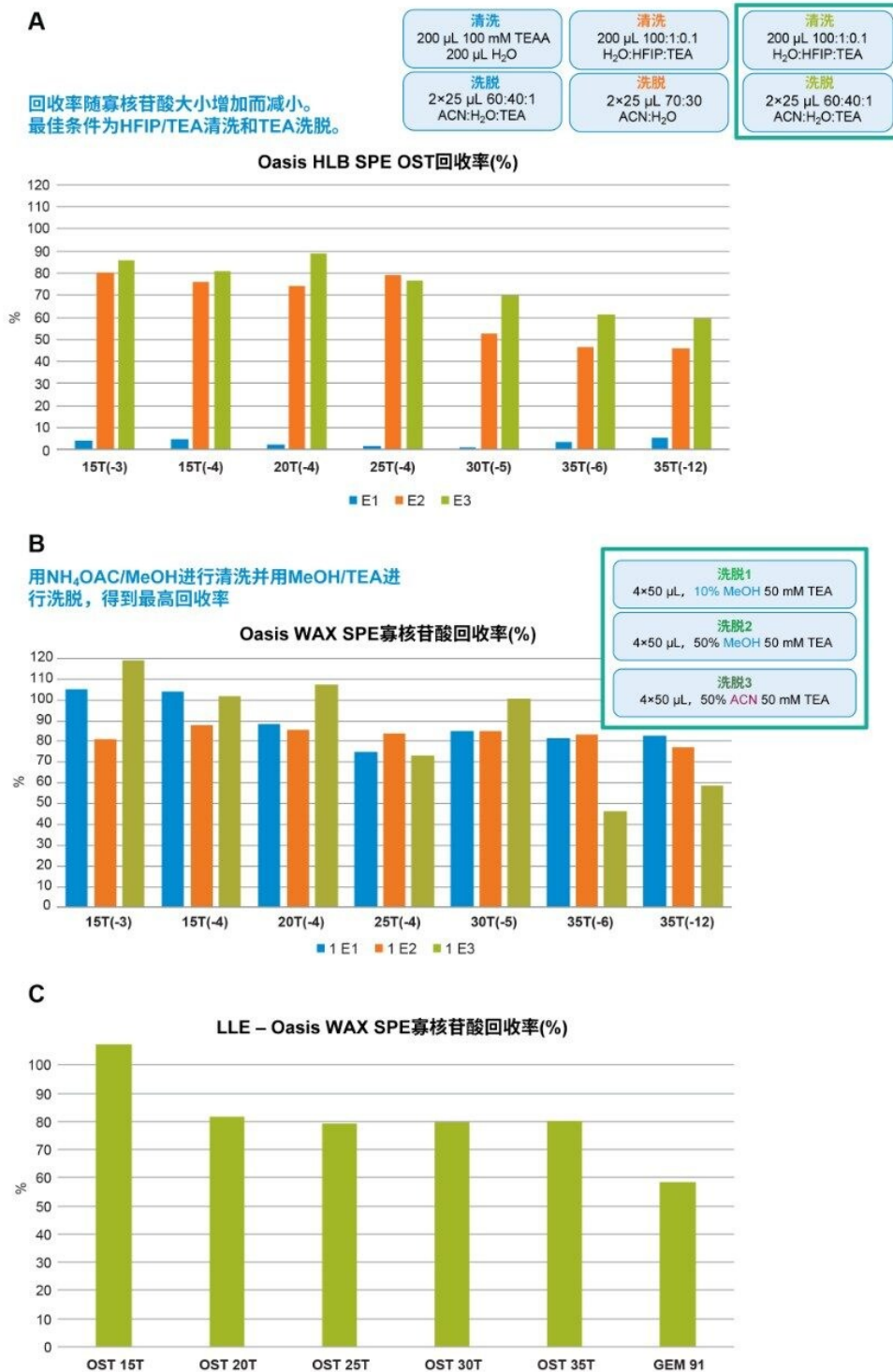


图6.在96孔 μ Elution提取版中使用(A) Oasis HLB SPE、(B) Oasis WAX SPE和(C) LLE-WAX SPE进行寡核苷酸样品

前处理获得的回收率。对于HLB，使用HFIP/TEA清洗液和ACN/TEA洗脱液可使OST和GEM91获得出色的寡核苷酸回收率；对于WAX，使用乙酸铵/MeOH清洗液和MeOH/TEA洗脱液可使OST和GEM91获得出色的寡核苷酸回收率。将LLE与WAX SPE结合使用，可确保高效破坏血浆中的寡核苷酸/血浆结合。

寡核苷酸与血浆蛋白质的结合非常强，高效破坏这种结合对于提高它们在血清/血浆中的回收率至关重要。因此，进行SPE之前，对制得的寡核苷酸血浆/血清样品进行液-液萃取(LLE)。使用实验部分所述的LLE方案，所有评估的寡核苷酸回收率均高于80%（数据未显示）。最终LLE-SPE条件如图2C所示。使用这一整套提取方法（裂解/中和预处理、LLE和Oasis WAX SPE），可确保有效破坏血浆蛋白结合，同时提高回收率和选择性。OST标准品和GEM91的最终LLE-WAX SPE回收率如图6C所示。为使回收率整体提高，采用80% 50 mM TEA:20% MeOH溶液(pH 9)和80% H₂O:20% MeOH溶液（含1%螯合剂，pH 11）进行连续洗脱。除提高回收率外，使用μElution提取板进行SPE还可以避免使用不利于MS分析的变性/裂解缓冲液、促进样品浓缩，从而提高整个分析的灵敏度并确保系统稳定耐用。在样品进样前后，使用Waters MassPREP OST标准品验证每次分析的LC-MS系统性能（保留时间/峰面积）。15 mer、25 mer和35 mer OST标准品的系统性能验证结果见图7。

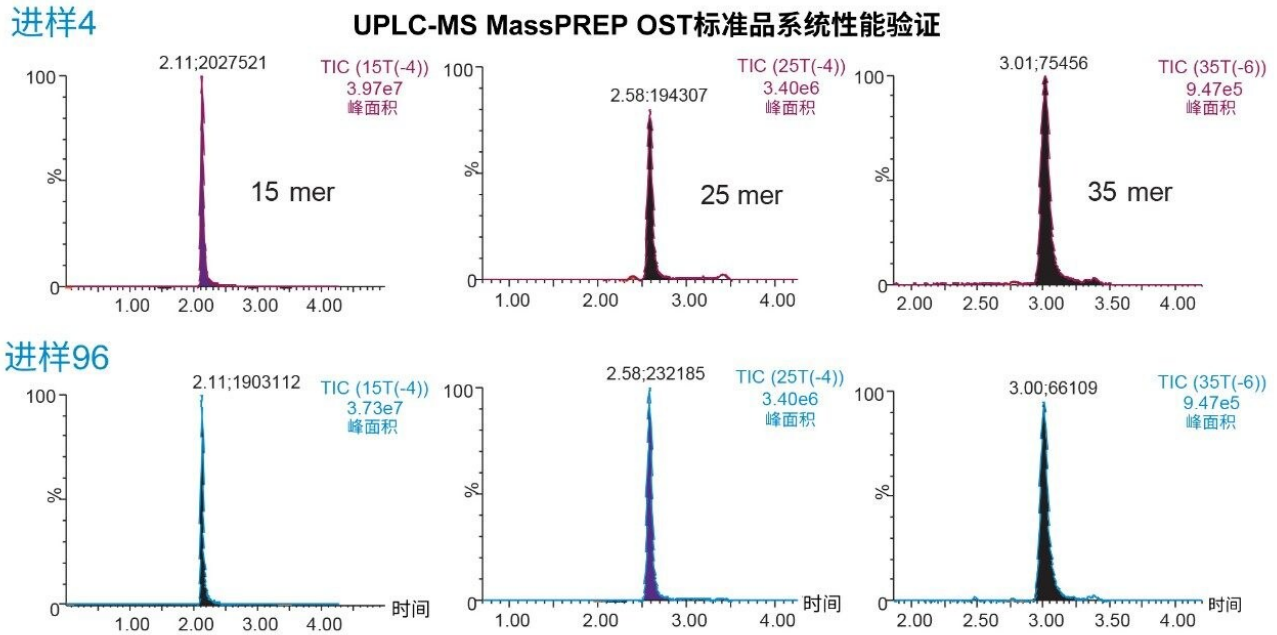


图7.使用Waters MassPREP OST标准品(2 nmol/mL)进行UPLC-MS系统性能验证。第4次和第96次进样的结果比较表明，保留时间/峰面积（15 mer、25 mer和35 mer）在整个分析中保持不变。

正确选择MS碎片结合ACQUITY Premier C₁₈寡核苷酸分析专用柱可提高回收率，选择性SPE净化使通过LLE-WAX SPE制得的纯样品和后加标样品的定量限能够达到0.0025 nmol/mL (OST 15 mer)和50 ng/mL (GEM91)。15 mer OST定量性能（线性动态范围和LOQ）的示例图分别参见图8（纯溶液）和图9（后加标提取血浆）中的A图和B图。对于GEM91，达到的检测下限为2.5 ng/mL（图10）。GEM91定量性能（线性动态范围和LOQ）的示例图分别参见图11（纯溶液）和图12（后加标提取血浆）中的A图和B图。

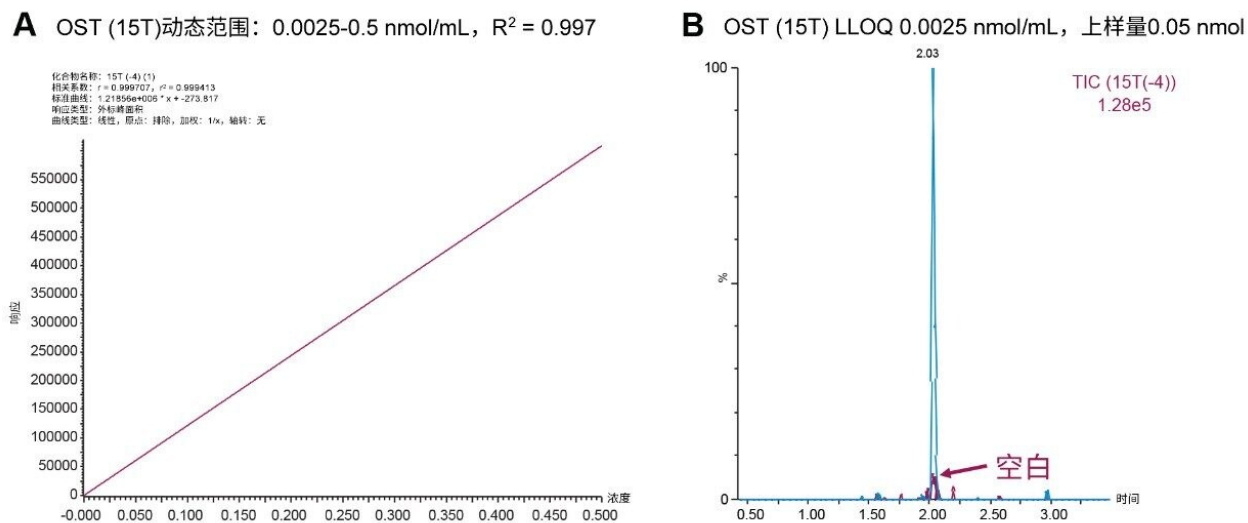
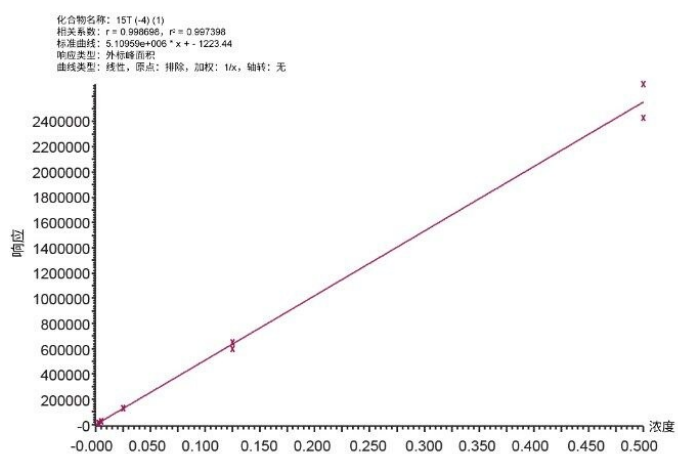


图8.SPE洗脱液中加标的(A) OST 15T标准品和(B) LLOQ标准品的代表性标准曲线(0.025–0.5 nmol/mL)

A OST (15T)动态范围: 0.0025-0.5 nmol/mL, $R^2 = 0.998$



B OST (15T) LLOQ 0.0025 nmol/mL, 上样量0.02 pmol

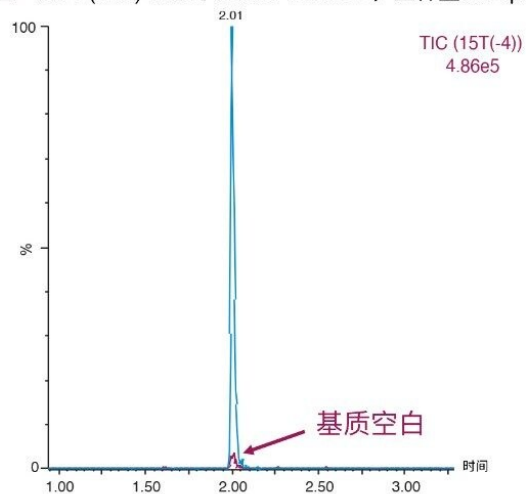


图9.LLE-SPE提取血浆中后加标的(A) OST 15T标准品和(B)LLOQ标准品的代表性标准曲线(0.025-0.5 nmol/mL)

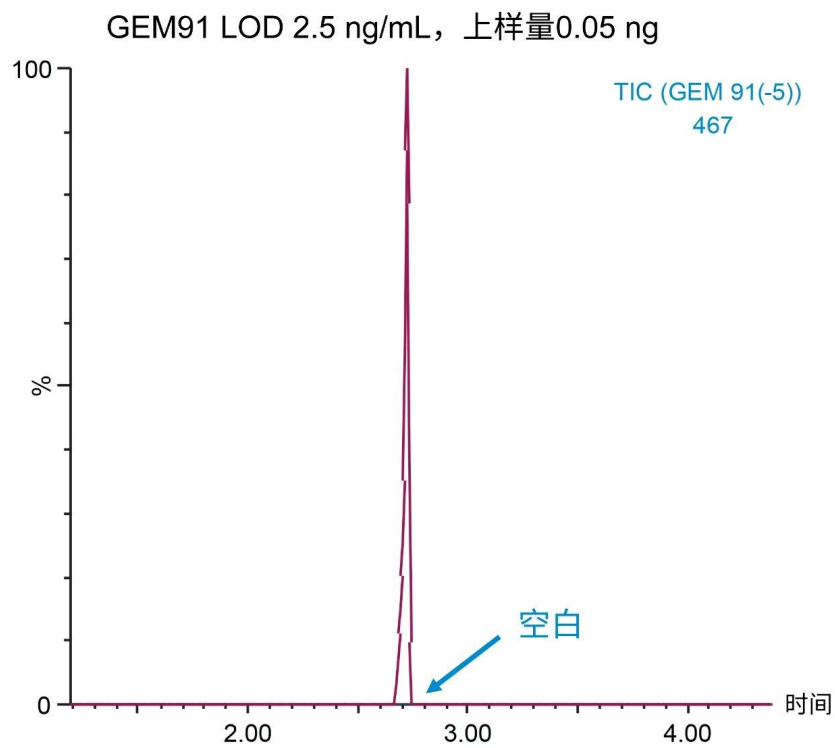
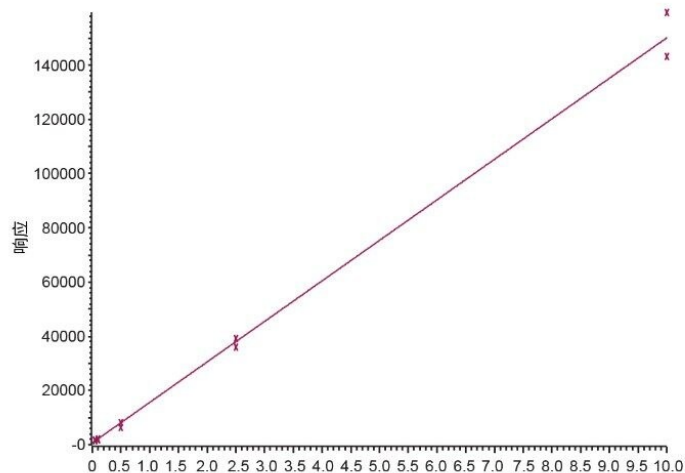


图10. GEM91的色谱图，突出显示纯溶液（上样量0.05 ng）的LOD为2.5 ng/mL

A GEM91动态范围：0.05-10 $\mu\text{g/mL}$, $R^2 = 0.997$

化合物名称: Gem91 (-5) (1)
相关系数: $r = 0.997396$, $r^2 = 0.994789$
标准曲线: $14943.9 \times x + 644.538$
响应类型: 外标峰面积
曲线类型: 线性, 原点: 排除, 加权: 1/x, 轴转: 无



B GEM91 LLOQ 0.05 $\mu\text{g/mL}$, 上样量1 ng

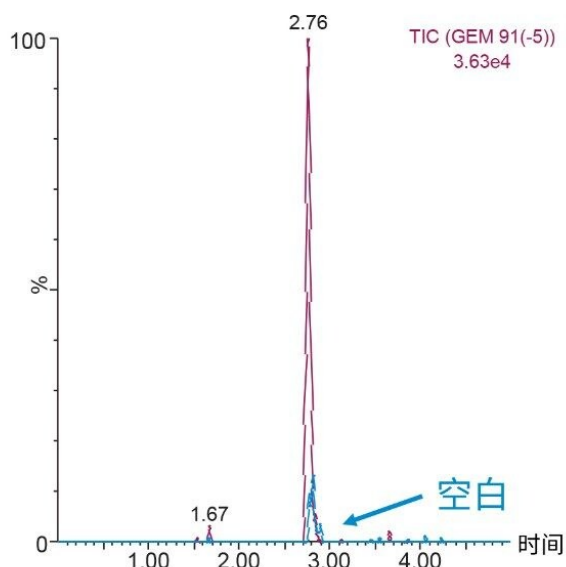
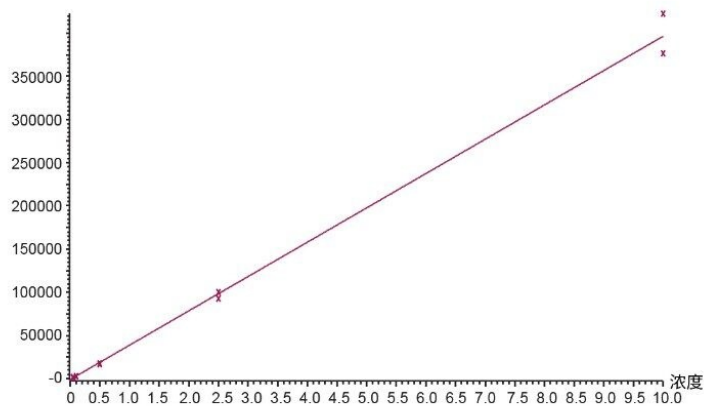


图11.SPE洗脱液中加标的(A) GEM91和(B) LLOQ标准品的代表性标准曲线(0.05-10 $\mu\text{g/mL}$)

A GEM91动态范围：0.05-10 $\mu\text{g/mL}$, $R^2 = 0.998$

化合物名称: Gem91 (-5) (1)
相关系数: $r = 0.998263$, $r^2 = 0.996530$
标准曲线: $39724.9 \times x - 886$
响应类型: 外标峰面积
曲线类型: 线性, 原点: 排除, 加权: 1/x, 轴转: 无



B GEM91 LLOQ 0.05 $\mu\text{g/mL}$, 上样量4 ng

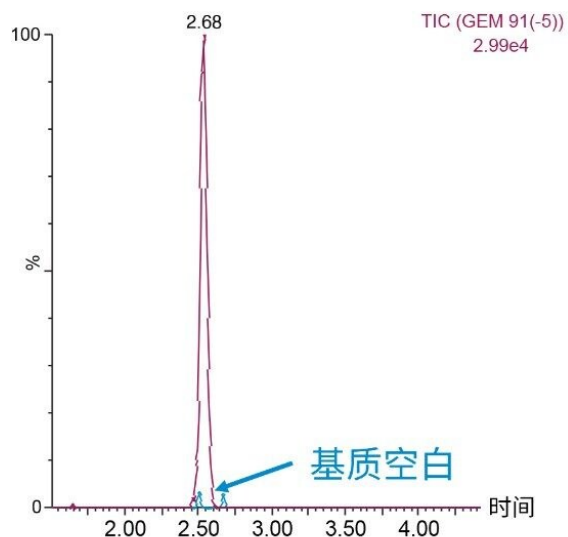


图12.LLE-SPE提取血浆中后加标的(A) GEM91和(B) LLOQ标准品的代表性标准曲线(0.05-10 $\mu\text{g/mL}$)

结论

本应用纪要重点介绍了从纯溶液和提取血浆中成功提取并定量寡核苷酸的方法。所开发的方法将高选择性、高灵敏度UPLC-MS/MS分析与LLE-SPE样品萃取相结合，其中使用 μ Elution提取板规格的Oasis WAX SPE进行样品萃取，可实现样品浓缩和高回收率。使用ACQUITY Premier C₁₈寡核苷酸分析专用柱使色谱回收率大幅提升，并使研究的寡聚dT和反义寡核苷酸获得了更低的LOD和LLOQ。所开发的方法具有优异的分析灵敏度，使脱氧胸苷15T OST标准品的柱上LLOQ达到0.05 pmol，全硫代磷酸化反义寡核苷酸GEM91的柱上LOD达到0.05 ng。

参考资料

1. GEM91 图片，2020年9月18日访问。 <https://www.google.com/imgres?imgurl=https%3A%2F%2Fpubchem.ncbi.nlm.nih.gov%2Fimage%2Fimgsrv.fcgi%3Fcid%3D16204535%26t%3Dl&imgrefurl=https%3A%2F%2Fpubchem.ncbi.nlm.nih.gov%2Fcompound%2FTrecovirsodium&tbnid=zslKeidmEWSzsM&vet=12ahUKEwj8066Bj_XrAhXLAN8KHQf5B6oQMygGegUIARCaAQ..i&docid=Y1Clm0B2xVZv6M&w=300&h=300>

特色产品

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

Xevo TQ-XS三重四极杆质谱仪 <<https://www.waters.com/134889751>>

MassLynx MS软件 <<https://www.waters.com/513662>>

TargetLynx <<https://www.waters.com/513791>>

720007019ZH，2020年9月

© 2023 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](#)