

应用纪要

反义寡核苷酸的高灵敏度LC-MS/MS生物分析定量

Suma Veeramachineni, Mark Wrona

Waters Corporation

摘要

本应用纪要介绍了Waters™ Xevo™ TQ Absolute串联四极杆质谱仪(MS/MS)的定量和定性能力，并说明这款仪器适用于人血浆中寡核苷酸的生物分析。



Xevo TQ Absolute串联四极杆质谱仪

优势

- Waters Xevo TQ Absolute串联四极杆质谱仪能够对人血浆中的寡核苷酸进行高灵敏度常规定量
- 定量从人血浆中提取的25 mer全硫代反义寡核苷酸Trecoversin (GEM91)和寡聚脱氧胸苷15~30 mer寡核苷酸

标准品，分子量范围4.5~9 kDa

- Waters ACQUITY™ Premier UPLC系统和Waters ACQUITY Premier C₁₈寡核苷酸分析专用柱技术提升了该应用在多个关键生物分析挑战方面的性能，例如提高色谱回收率、改善LLOQ和增加线性动态范围

简介

寡核苷酸成为一种难以测量的底物是由多种因素导致的，包括但不限于：需要离子对或非反相色谱；需要精细的处理和样品制备；经常与耗材发生非特异性结合并且经常与色谱系统中存在的金属表面相互作用。

本应用纪要展示了高性能Xevo TQ Absolute串联四极杆质谱仪与Waters ACQUITY Premier联用系统分析生物基质中寡核苷酸的性能。本研究定量分析了寡聚脱氧胸苷标准品（Waters MassPREP™寡核苷酸分离技术(OST)标准品）和全硫代反义寡核苷酸GEM91 [d(P-Thio)(C-T-C-T-C-G-C-A-C-C-C-A-T-C-T-C-T-C-C-T-T-C-T)-DNA]。

实验

使用内部配制的TE缓冲液（10 mM Tris + 1mM EDTA，用氢氧化铵将pH调节至8）制备Waters MassPREP寡核苷酸分离技术(OST)标准品（部件号：186004135 <<https://www.waters.com/nextgen/global/shop/standards--reagents/186004135-massprep-oligonucleotide-standard.html>>）和寡聚脱氧核苷酸硫代磷酸酯GEM91（由Integrated DNA Technologies, Inc.定制合成）的储备液，浓度分别为10 μM和1 mg/mL。血浆样品通过连续稀释人血浆储备液（购自BioIVT）制备。血浆样品用苯酚:氯仿:异戊醇25:24:1通过液-液萃取法萃取，然后用+99%的氯仿进行二次萃取。最后，蒸干水提液，并复溶于100 μM EDTA溶液中。

液相色谱条件

液相色谱系统： Waters ACQUITY Premier系统(BSM)

流动相A： 含有100 mM六氟异丙醇(HFIP) + 15 mM

	N,N-二异丙基乙胺(DIPEA)的水溶液
流动相B:	含有100 mM六氟异丙醇(HFIP) + 15 mM N,N-二异丙基乙胺(DIPEA)的80%乙腈溶液
样品瓶/样品板:	搭载MaxPeak™的QuanRecovery™样品板, 容积 700 μL (部件号: 186009185) 带圆形塞预开口硅胶盖垫 (部件号: 186006332)
色谱柱:	Waters ACQUITY Premier C ₁₈ 寡核苷酸分析专用 柱, 1.7 μm, 2.1 x 50 mm (部件号: 186009484)
柱温:	50 °C
样品温度:	8 °C
进样体积:	20 μL
流速:	0.5 mL/min

梯度

时间 (min)	流速 (mL/min)	%A	%B	曲线
初始	0.5	95.0	5.0	初始
3.50	0.5	78.0	22.0	6
4.00	0.5	20.0	80.0	6
4.50	0.5	95.0	5.0	6
5.00	0.5	95.0	5.0	6

质谱条件

电离模式:	ESI-
采集类型:	MRM
毛细管电压:	2.5 kV
锥孔电压:	30 V
电离源补偿:	30
离子源温度:	150 °C
脱溶剂气温度:	600 °C
脱溶剂气流速:	1000 L/h

锥孔气流速：150 L/h

碰撞气体流速：0.15 mL/min

名称	母离子 <i>m/z</i>	子离子 <i>m/z</i>	锥孔电压 (V)	碰撞能量 (eV)
15T	561.8	125.1	30	35
20T	601.1	125.1	30	35
25T	627.3	303.1	30	20
30T	646.5	303.1	30	20
GEM91	597.2	319.1	30	20
GEM132(内标)	732.7	319.0	30	40

表1.寡核苷酸分析所用的MRM通道和条件

数据管理

使用MassLynx™ v4.2采集数据，使用TargetLynx™处理数据。

结果与讨论

在配备ACQUITY Premier 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)) 的ACQUITY Premier系统上进行色谱分离，使用5分钟梯度（流动相B由5%升高至80%），流速为0.5 mL/min。ACQUITY Premier色谱柱在硬件上采用了MaxPeak™高性能表面(HPS)技术，这对于尽可能减少非特异性结合来说至关重要，并因此提高了寡核苷酸回收率和分析检测限。HPS技术专为尽量减少金属与分析物（例如寡核苷酸和其他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^{1,2}。

GEM91的典型谱图见图1，图中显示了电荷态峰簇的大体分布（MS扫描），MS/MS谱图显示了被选作GEM91的MRM通道母离子的电荷态产生的碎片。在方法开发过程中可能会监测多个离子。如果首选离子受到干扰，可以轻松选择不同峰簇和合适的碎片离子。

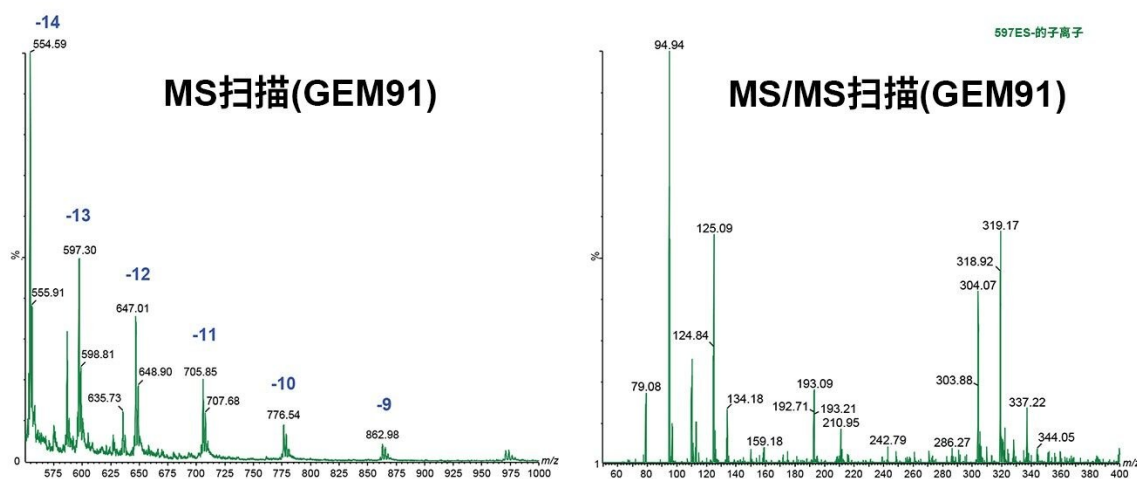


图1.GEM91的代表性谱图（左）和MS/MS谱图（右）

图2A显示了GEM91 (m/z 597.2 > 319.1) LLOQ相对于基质背景的代表性迹线。

图2B显示了0.1~500 ng/mL QC样品的代表性迹线。

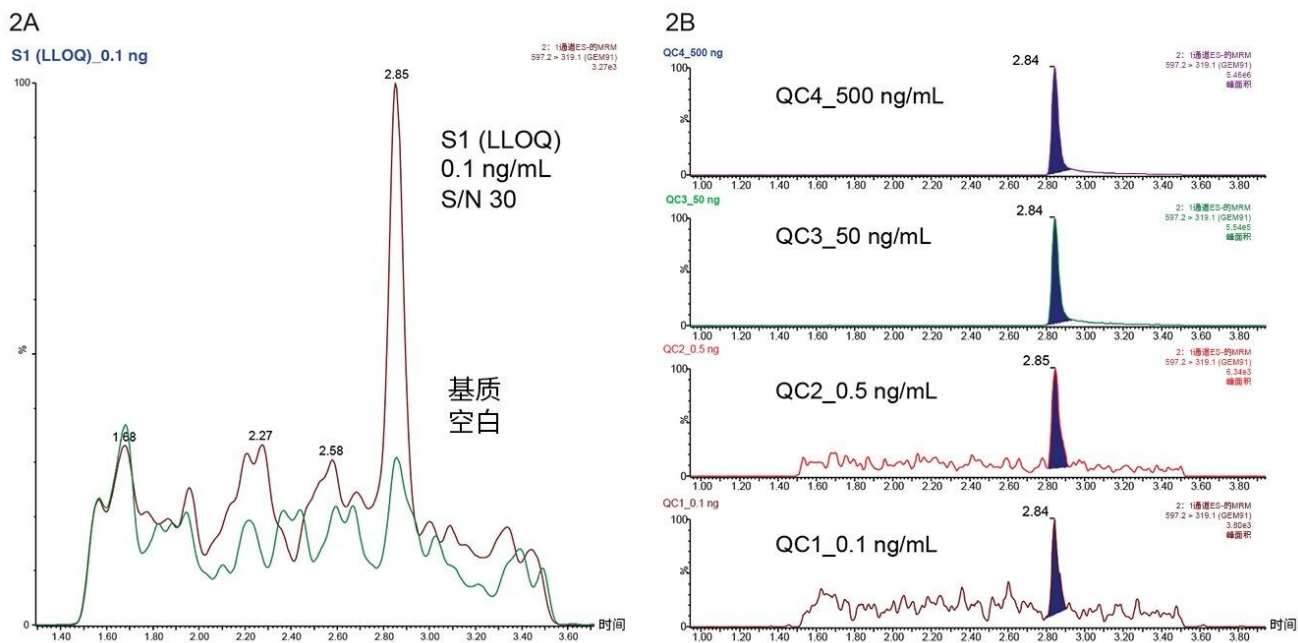


图2A.GEM 91 (597.2>319.1) 0.1 ng/mL标准品(LLOQ)与空白基质 (绿色痕迹) 的叠加图

图2B.GEM91 QC样品(0.1–500 ng/mL)的代表性迹线

OST标准品和GEM 91在Xevo串联四极杆质谱仪上的标准曲线和质量控制(QC)性能总结见表2。OST储备液的制备单位为 μM ，报告单位为nM，对应的LLOQ (ng/mL)见表格右半部分，GEM91的报告单位为nM和ng/mL。

名称	OST (准确度 (%))					GEM91			LLOQ (ng/mL)
	标准品浓度 (nM)	15T	20T	25T	30T	标准品浓度 (ng/mL)	标准品浓度 (nM)	准确度 (%)	
标准品1	0.01	94.5	103.7	105.4	-	0.10	0.08	110.2	15T 0.045
标准品2	0.02	107.3	94.8	92.9	101.6	0.20	0.16	82.1	20T 0.06
标准品3	0.05	111.2	93.9	87.3	90.6	0.50	0.39	92.8	25T 0.075
标准品4	0.10	96.0	95.6	111.9	111.6	1.00	0.78	98.4	30T 0.090
标准品5	0.20	99.5	111.1	88.8	98.4	2.00	1.60	97.0	
标准品6	1.00	101.1	104.8	104.8	100.9	10.0	7.80	97.8	
标准品7	10	96.6	104.1	103.8	102.1	100	78.0	106.2	
标准品8	100	99.3	99.8	105.2	111.1	1000	780	108.9	
标准品9	500	98.6	100.5	101.2	93.9	5000	3890	107.4	
标准品10	1000	95.9	91.9	98.6	89.9	10000	7780	99.1	

表2. 本实验使用的校准标准品

定量下限(LLOQ)为0.1 ng/mL，动态范围为0.1–10000 ng/mL。校准曲线呈线性， r^2 值>0.99 (1/x²加权)，所有接受的校准点的平均准确度在87–112%之间。表3报告了寡核苷酸OST和GEM 91的QC性能，所有寡核苷酸的平均准确度在90–114%之间，CV（未显示）在1.1–10.5%之间。OST标准品的结果表明，与较长链的寡核苷酸相比，较短链的寡核苷酸可能具有更高的灵敏度。GEM91与长度相似的标准品表现出相似的结果，而15T标准品在LLOQ为0.05 ng/mL时的灵敏度是GEM91的两倍。

名称	标准品浓度 (nM)	OST (准确度 (%))				GEM91		
		15T	20T	25T	30T	QC浓度 (ng/mL)	QC浓度 (nM)	准确度 (%)
QC1	0.01	114.3	100.3	93.7	N/A	0.10	0.08	99.2
QC2	0.05	100.3	105.2	104.0	108.7	0.50	0.39	91.0
QC3	5.0	95.1	99.9	93.2	100.1	50	39.0	106.8
QC4	50	90.1	99.8	95.6	100.9	500	390	110.7
QC5	400	96.6	99.6	97.7	97.2	4000	3110	108.3
QC6	800	92.3	92.1	93.0	91.6	8000	6220	98.3

表3. 本实验使用的QC样品

在Xevo TQ Absolute上测试的几个通道都能够检出生物基质中亚ng/ml水平的GEM91寡核苷酸。图3显示了GEM91 LLOQ为0.1 ng/mL水平的三个通道。

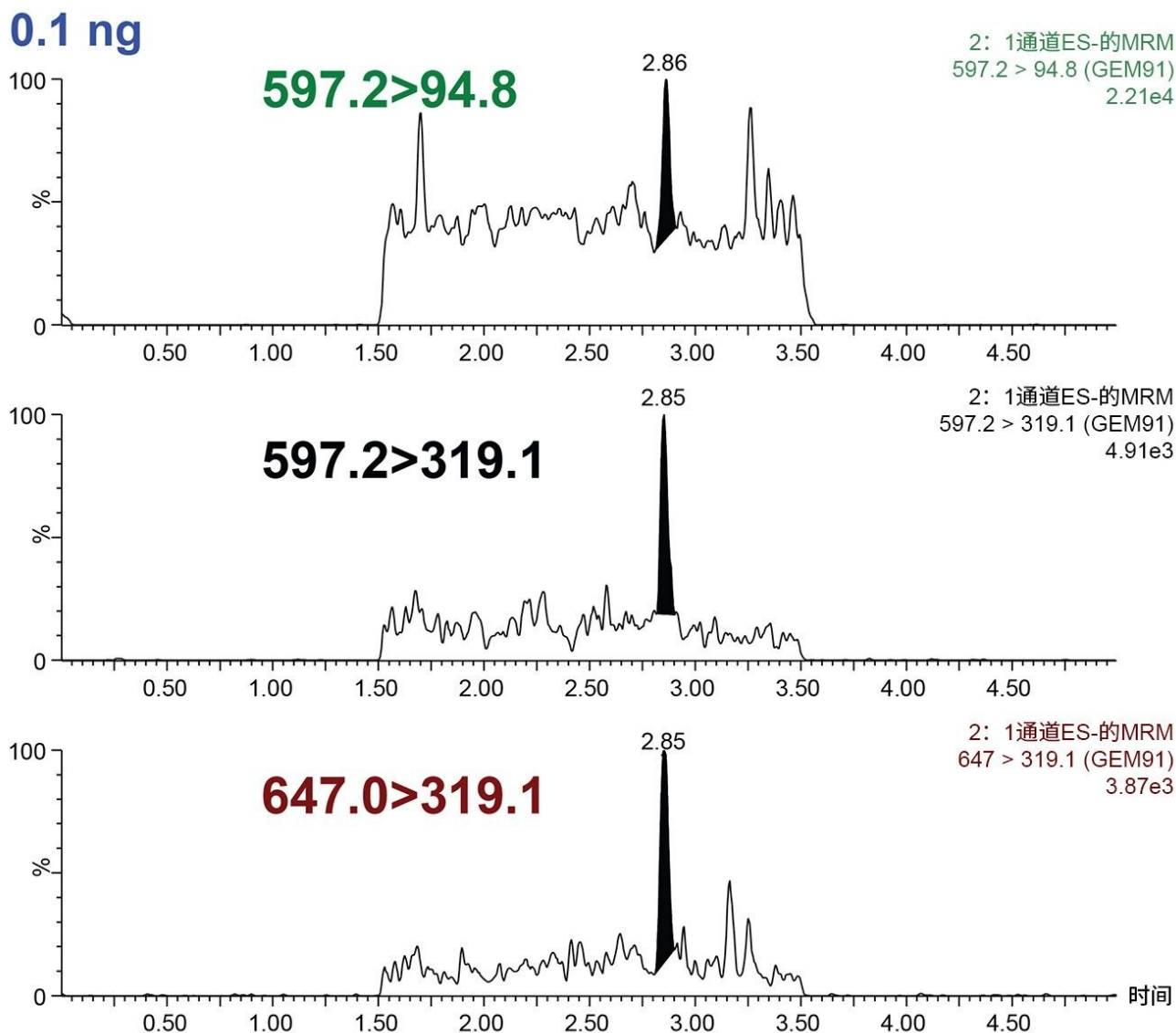


图3.不同通道检测0.1 ng/mL样品的能力

与基本结构部分相对应的低质量通道（例如，通过597.2 > 94.8通道测量的硫代磷酸酯碎片离子）通常是强度最高的碎片离子和有吸引力的定量目标，但在复杂的血浆基质背景中可能具有挑战性或选择性较低。本研究在LLOQ水平的低分子量和高分子量碎片质量通道中均观察到较高的离子计数和可接受的信噪比。319.1碎片离子的-14 (597 Da)和-13 (647 Da)电荷态迹线说明了597.2 > 94.8 MRM峰形和性能与本研究分子量更大的离子之间的差异。最终，这种灵活性有助于用户在临床前（和人体）研究的物种/基质变化中选择具有最佳灵敏度和选择性表现的通道。本应用纪要展示了使用 m/z 319.1子离子的-13电荷态(m/z 597.2)的QC、线性和生物分析价值图，然而，Xevo

TQ Absolute在0.1 ng/mL的LLOQ水平下检出了GEM91（与空白响应相比，响应值>5倍），且血浆样品的所有通道（如图3所示）都表现出类似的生物分析性能。

图4显示了MS系统上获得的0.1~10,000 ng/mL范围内GEM91 (597.2>319.1)的线性动态范围，并显示了10 ng/mL以下低水平校准标准品的放大图。观察到线性动态范围达到五个数量级。

化合物名称: GEM91
相关系数: $r = 0.995102$, $r^2 = 0.990229$
响应类型: 内标 (参比8), 峰面积*(内标浓度/内标峰面积)
曲线类型: 线性, 原点: 排除, 权重: $1/x^2$, 轴转: 无

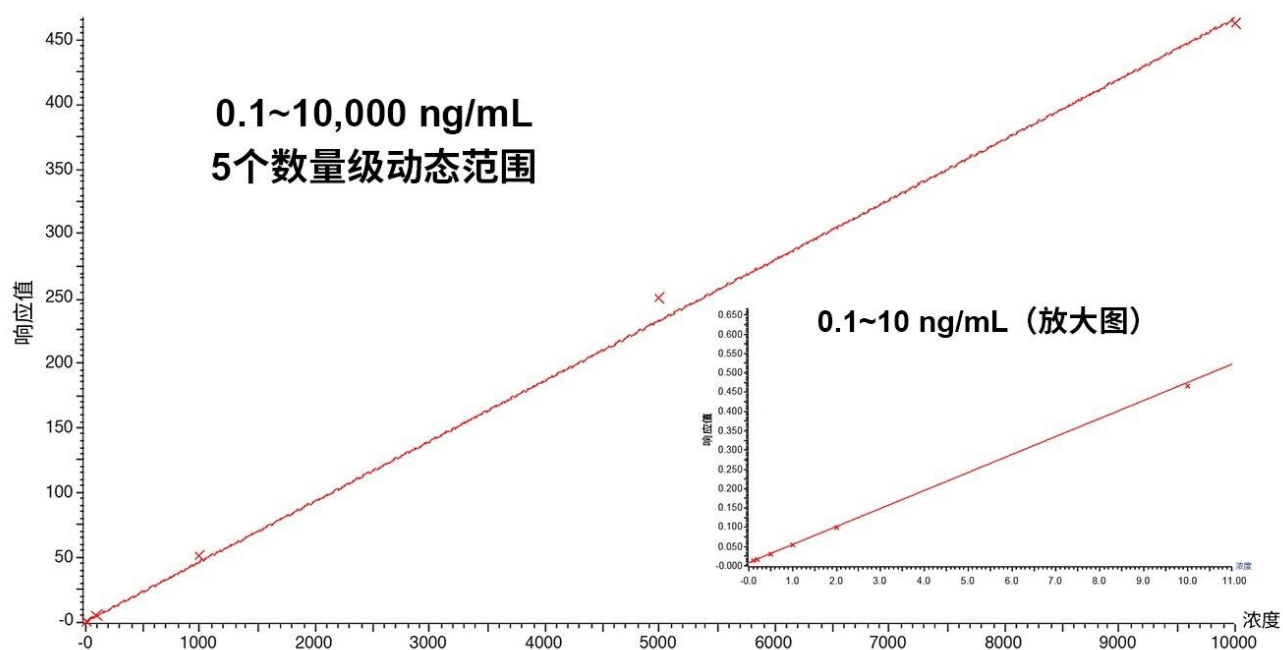


图4.在Xevo TQ Absolute上分析GEM 91获得的标准曲线，显示5x线性动态范围，插图所示为0.1-10 ng/mL标准品的放大图。

结论

- Xevo TQ Absolute对棘手的负电离化合物具有超高的灵敏度，能够为基于液相色谱/质谱联用法(LC-MS/MS)定量生物基质中寡核苷酸的常规应用生成高质量数据。

- 这款仪器在分析人血浆中的反义寡核苷酸和寡核苷酸性能标准品时，均观察到低至ng/ml水平的灵敏度和良好的动态范围性能。
- 如果分离系统和分析柱均使用搭载MaxPeak高性能表面(HPS)技术的ACQUITY Premier，将有助于缓解金属吸附，确保在定量生物分析中获得稳定、高灵敏度的定量性能。

参考资料

1. Guilherme J. Guimaraes, J. Michael Sutton, Martin Gilar, Michael Donegan, Michael G. Bartlett, ‘Impact of Nonspecific Adsorption to Metal Surfaces in Ion Pair-RP LC-MS Impurity Analysis of Oligonucleotides’ , *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* Volume 208, 20 January 2022, 114439.
2. Jennifer M Nguyen , Martin Gilar, Brooke Koshel, Michael Donegan, Jason MacLean, Zhimin Li & Matthew A Lauber, ‘Assessing the Impact of Nonspecific Binding on Oligonucleotide Bioanalysis’ , *Future Science*, BIOANALYSIS VOL.13, NO.16.
3. 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年1月.

特色产品

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

Xevo TQ Absolute </nextgen/cn/zh/products/mass-spectrometry-systems/xevo-tq-absolute.html>

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

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

720007574ZH, 2022年3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