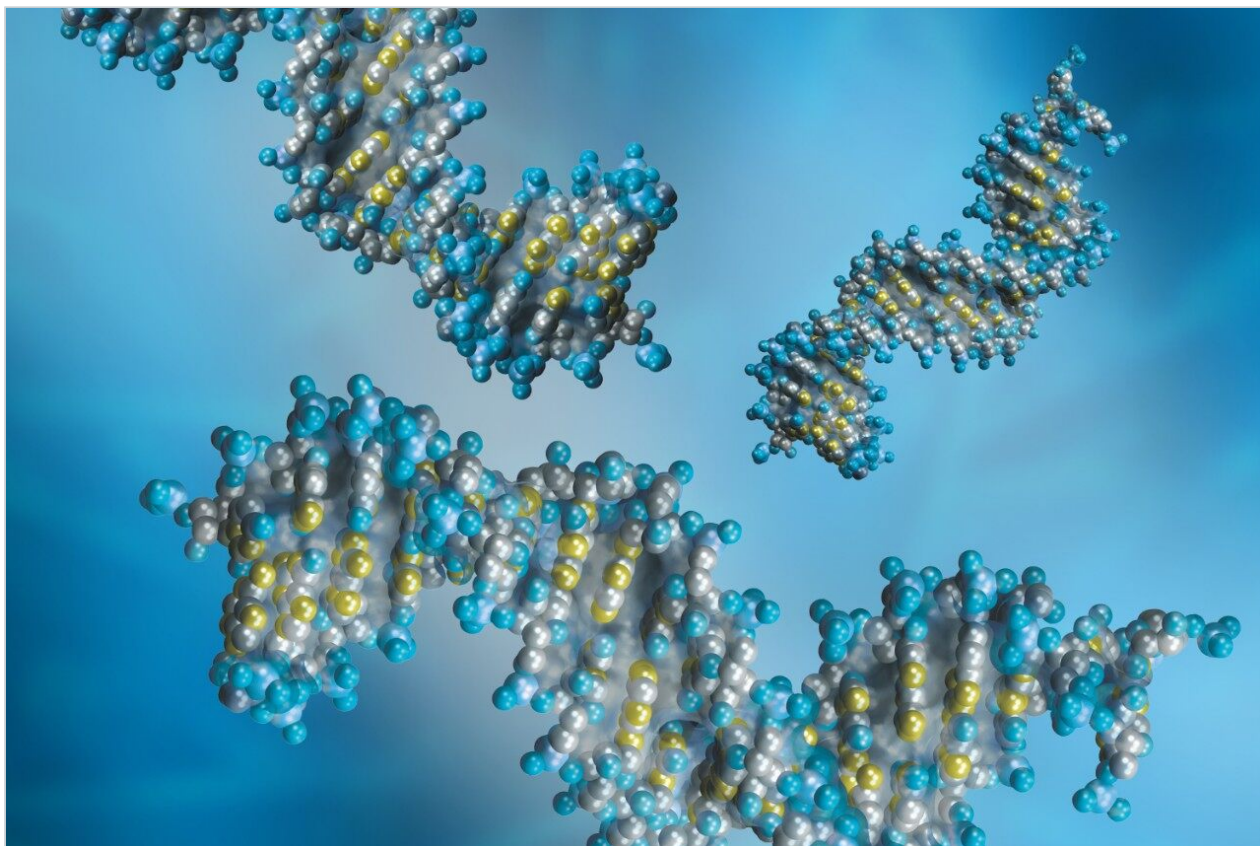


应用纪要

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

Kathryn Brennan, Mary Trudeau, Paul D. Rainville

Waters Corporation



这是一份应用简报，不包含详细的实验部分。

摘要

在寡核苷酸治疗药物的LC-MS/MS生物分析定量中，需要采用灵敏且稳定的分析方法以实现准确定量。本研究凸显了ACQUITY PREMIER色谱系统对寡聚脱氧胸苷(ODT)和寡核苷酸反义药物GEM91分析所带来的色谱性能提升。

优势

- 使用ACQUITY PREMIER系统和ACQUITY PREMIER C₁₈寡核苷酸分析专用柱可以改善寡核苷酸的回收率和峰形，最终改善方法检测限和重现性
- 有了ACQUITY PREMIER技术的助力，科研人员无需进行耗时的系统和色谱柱钝化，节省昂贵的离子对流动相试剂，大幅延长系统正常运行时间

简介


寡核苷酸的LC-MS分析方法开发存在诸多挑战，其中最具有代表性的是，这些化合物因其聚阴离子性质，非常容易吸附到金属表面。这种金属相互作用会对色谱性能产生不良影响，通常导致峰形不佳以及分析物回收率和重现性问题，最终限制分析方法的总体性能。通常使用高浓度寡核苷酸阻断吸附位点，对液相色谱系统和色谱柱进行活化或钝化。这种钝化方法虽然有效，但并不是长久之计。另一种常用方案是在流动相中使用螯合剂，例如EDTA。虽然这种方法也很有效，但使用螯合添加剂通常会对LC-MS分析产生不良影响，抑制质谱信号并降低灵敏度。

本文所述研究证明，使用ACQUITY PREMIER色谱系统和ACQUITY PREMIER C₁₈寡核苷酸分析专用柱能够改善寡核苷酸生物分析的定量性能。ACQUITY PREMIER技术采用MaxPeak高性能表面，专为防止因离子相互作用引起非特异性吸附而设计，能够显著改善寡核苷酸的峰形、回收率以及分析方法的整体重现性，且无需进行系统或色谱柱钝化。


结果与讨论

研究人员比较了ACQUITY PREMIER系统与ACQUITY UPLC I-Class PLUS系统(ACQUITY UPLC)的性能。使用


Xevo TQ-XS串联四极杆质谱仪进行质谱检测和定量。图1重点介绍了在本评估研究的LLE-SPE样品前处理和LC-MS分析阶段使用的沃特世系统和产品，完整详细信息可参见应用纪要720007019EN <<https://www.waters.com/nextgen/us/en/library/application-notes/2020/improved-oligonucleotide-spe-lc-ms-analysis-using-maxpeak-high-performance-technology.html>>。




ACQUITY PREMIER系统可改善金属敏感分析物的色谱性能，大幅缩短分析方法开发时间，降低风险，并提高整体实验室效率。



ACQUITY PREMIER C₁₈寡核苷酸分析专用柱能够提供出色的寡核苷酸峰形和回收率，提高选择性和灵敏度，同时能够进行快速分析。



Xevo TQ-XS串联四极杆质谱仪能够对寡核苷酸进行灵敏、可靠、可重现的定量。



Oasis μElution WAX SPE萃取技术可提供高回收率(> 75%)和样品浓度。
MassPREP寡核苷酸分离技术(OST)标准品有利于验证仪器和色谱柱的性能。
QuanRecovery 96孔收集板旨在减少生物分子的疏水性非特异性吸附(NSB)，保障寡核苷酸回收率。

图1.寡核苷酸定量生物分析：沃特世工具

比较标准ACQUITY C₁₈寡核苷酸分析专用柱和标准ACQUITY UPLC系统与ACQUITY PREMIER色谱柱和ACQUITY PREMIER系统发现，后者的寡核苷酸回收率（峰面积/峰高）明显提升。图2和图3分别展示了GEM91和20 mer寡聚脱氧胸苷的结果。从图中可以看出，完全硫代磷酸化寡核苷酸GEM91表现出非常优异的累积回收率提升（超过12倍）。虽然采用ACQUITY PREMIER色谱柱时，已经在评估的所有寡核苷酸中观察到峰拖尾有所减小，但是将ACQUITY PREMIER系统与ACQUITY PREMIER色谱柱结合使用后，观察到35 mer寡聚脱氧胸苷分析的色谱性能得到更显著的改善（图4）。

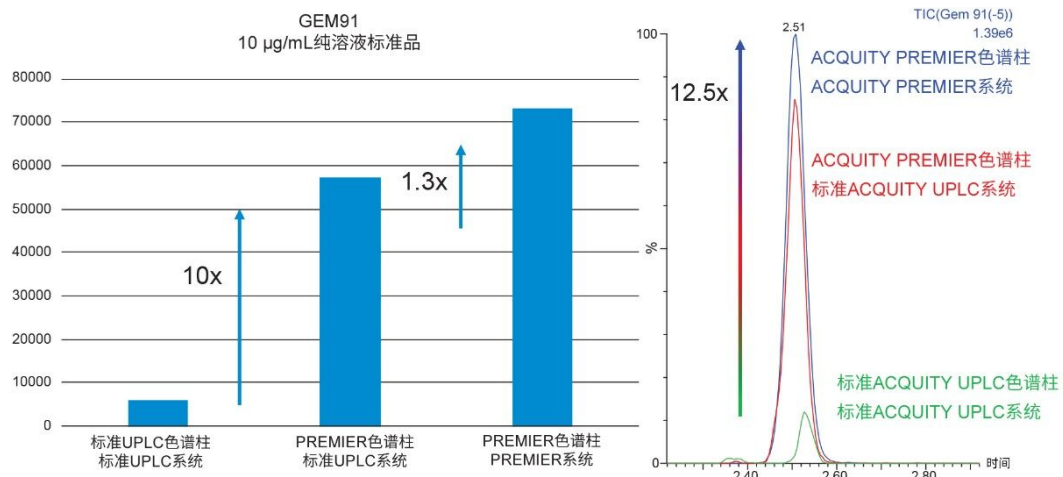


图2.与标准ACQUITY UPLC I-Class系统和标准UPLC色谱柱相比,使用ACQUITY PREMIER系统和ACQUITY PREMIER色谱柱对GEM91分析展现出更高的色谱性能。

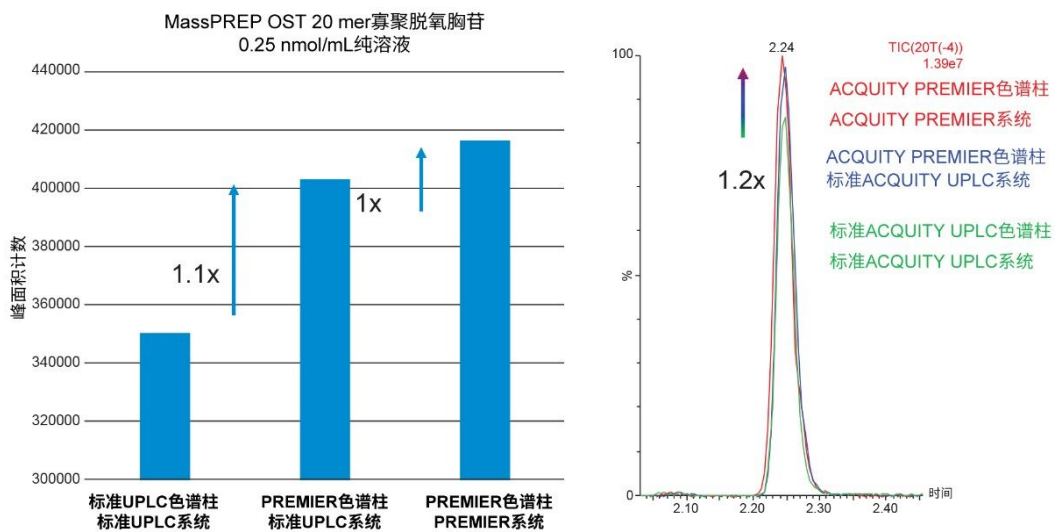


图3.与标准ACQUITY UPLC I-Class系统和标准UPLC色谱柱相比,使用ACQUITY PREMIER系统和ACQUITY PREMIER色谱柱对20 mer寡聚脱氧胸苷分析展现出更高的色谱性能。

35 mer寡聚脱氧胸苷

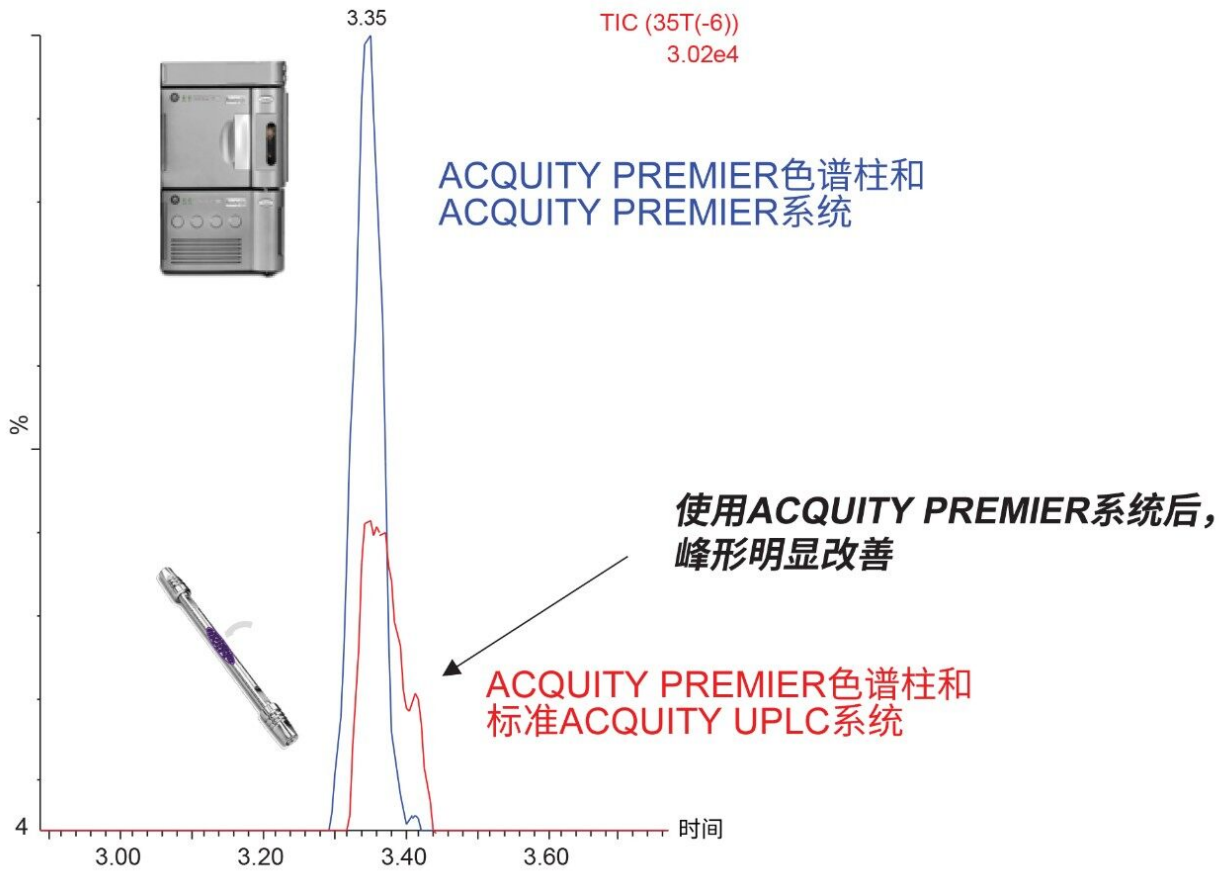


图4.与标准ACQUITY UPLC I-Class系统相比,使用ACQUITY PREMIER系统改善了35 mer寡聚脱氧胸苷的峰形。

根据小分子生物分析方法开发指南^{1,2},开发的分析方法必须能够证明线性(相关系数或 $R^2 \geq 0.98$)、准确度($\pm 15\%$)和精密度($\pm 15\%$)。使用ACQUITY PREMIER色谱柱与标准ACQUITY UPLC系统(图5A)即可满足这些标准,该分析方法对后加标提取血浆的定量下限(LLOQ)达到50 ng/mL(图6)。将ACQUITY PREMIER系统与ACQUITY PREMIER色谱柱结合使用后,可以看到GEM91的定量性能进一步提升(图5B)。在整个标准曲线浓度范围内,使用标准ACQUITY UPLC系统与ACQUITY PREMIER系统获得的线性(R^2)从0.996提高至0.999,重现性(RSD)范围从3.8~29.5%提升至0.95~7.2%。使用ACQUITY PREMIER系统和ACQUITY PREMIER色谱柱获得的GEM91定量性能(准确度和精密度)进一步提升,如图7中各校准标样的结果所示。

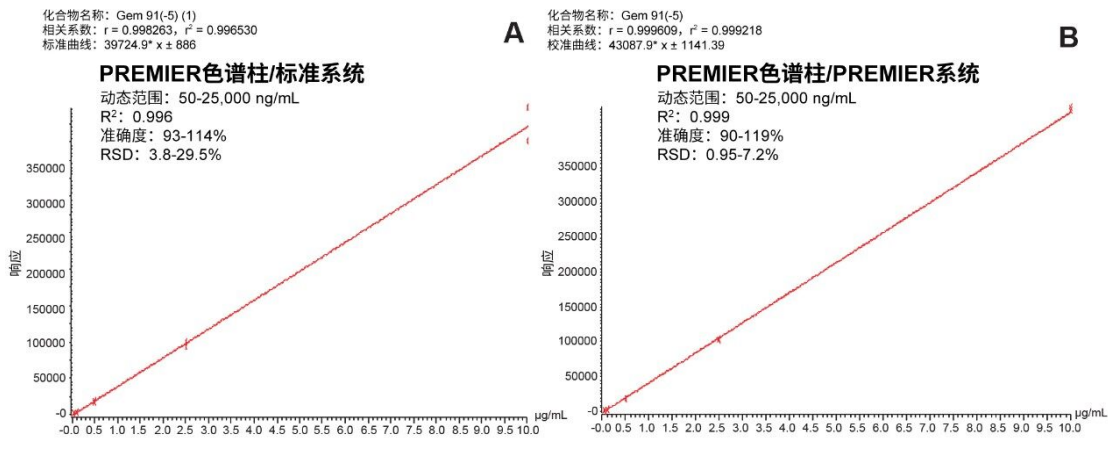


图5.提升定量性能。ACQUITY UPLC I-Class (A)与ACQUITY PREMIER (B)系统定量分析后加标提取血浆中GEM91的性能比较。

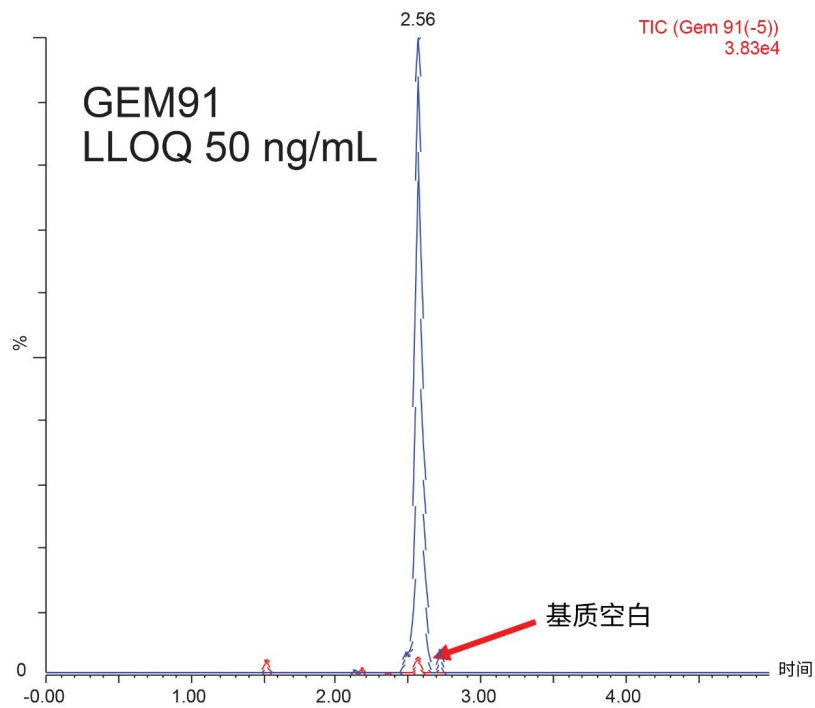


图6.使用ACQUITY PREMIER系统和ACQUITY PREMIER色谱柱实现了GEM91的高灵敏度定量与检测，在后加标提取血浆中的LLOQ达到50 ng/mL。

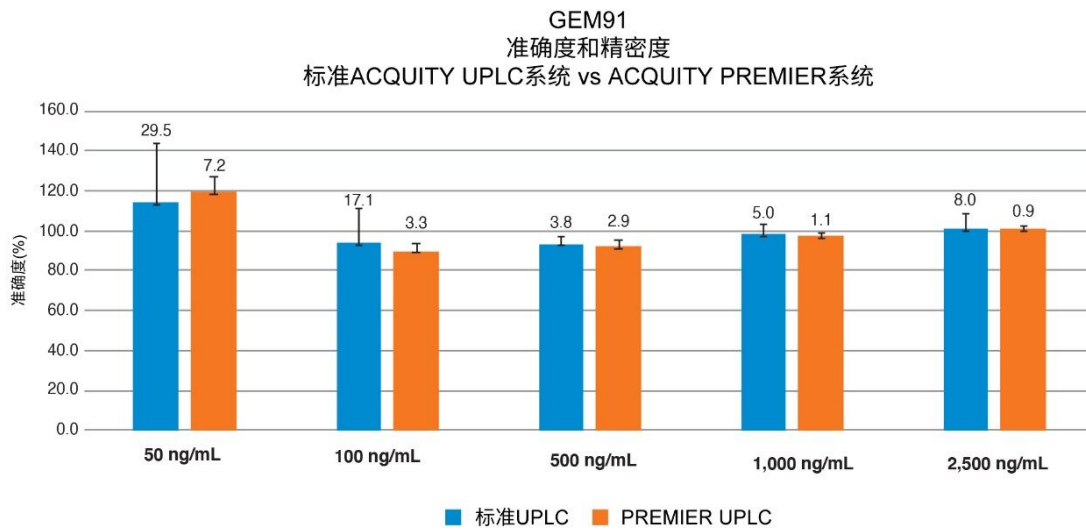


图7.使用ACQUITY PREMIER系统和ACQUITY PREMIER色谱柱提高了后加标提取血浆中GEM91标准曲线的准确度和精密度

结论

使用ACQUITY PREMIER系统和ACQUITY PREMIER色谱柱开发出用于寡聚脱氧胸苷和GEM91寡核苷酸定量的高灵敏度MRM方法，二者在提取血浆中的LLOQ分别达到0.025 nmol/mL和50 ng/mL。ACQUITY PREMIER技术可大幅提升定量性能，同时改善灵敏度、线性($R^2 \geq 0.999$)、准确度（在90~119%范围内）和动态范围内的平均RSD (0.95~7.2%)，表明该方法具有出色的准确度、精密度和重现性。此概念论证方法在准确定量寡核苷酸以支持药物发现和研究方面表现出巨大的潜力。

参考资料

1. Viswanathan CT, Bansal S, Booth B, DeStefano AJ, Rose MJ, Sailstad J, Shah VP, Skelly JP, Swann PG, Weiner R. Quantitative Bioanalytical Methods Validation and Implementation: Best Practices for Chromatographic and Ligand Binding Assays. *Pharm.Res.*2007, 24, 1962–1973.
2. Bansal S, DeStefano A. Key Elements of Bioanalytical Method Validation for Small Molecules. *AAPS*

J. 2007, 9, E109–114.

特色产品

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

ACQUITY UPLC系统 <<https://www.waters.com/514207>>

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>>

Otto SPeCialist正压萃取装置 <<https://www.waters.com/waters/nav.htm?cid=135073532>>

720007119ZH, 2021年1月