

使用Xevo G2-XS QToF质谱仪对寡核苷酸进行HRMS定量

Mark Wrona, Suma Veeramachineni

Waters Corporation

摘要

本应用展示了Xevo G2-XS QToF的定量和定性功能及其对寡核苷酸生物分析的适用性。本研究还表明，该方法在常规使用中的性能与Xevo TQ-XS三重四极杆质谱仪相当。

优势

- 高分辨率Xevo G2-XS QToF质谱仪适用于常规定量寡核苷酸，例如GEM 91 (Trecorvirsen)
- ACQUITY Premier UPLC系统和ACQUITY Premier C₁₈寡核苷酸分析专用柱技术可改善寡核苷酸色谱回收率、LLOQ和线性动态范围

简介

HRMS定量分析因多种因素受到越来越多的关注，包括质量范围增加、替代选择性（相对于串联SRM/MRM），最重要的是，该方法具有额外收集定性数据的能力。HRMS仪器的定量性能与串联（三重）四极杆仪器相当，同时还可以为现代生物分析实验室提供额外的选择性方案和采集分析模式（包括DIA、DDA和靶向模式）。HRMS的应用

日渐增加，尤其是在寡核苷酸领域¹。

本应用纪要简单介绍了Xevo G2-XS QToF HRMS平台在寡核苷酸分析中的性能，并与三重四极杆平台比较了典型的生物分析性能指标。Xevo TQ-XS三重四极杆的性能和方法已在之前的应用纪要中详细介绍³。

为了证明HRMS的检测和定量能力，我们使用ACQUITY Premier UPLC系统在Xevo G2-XS QToF上分析了寡聚脱氧胸苷标准品以及GEM91（一种全硫代磷酸化反义寡核苷酸，图1），并与串联四极杆质谱仪进行了比较⁴。

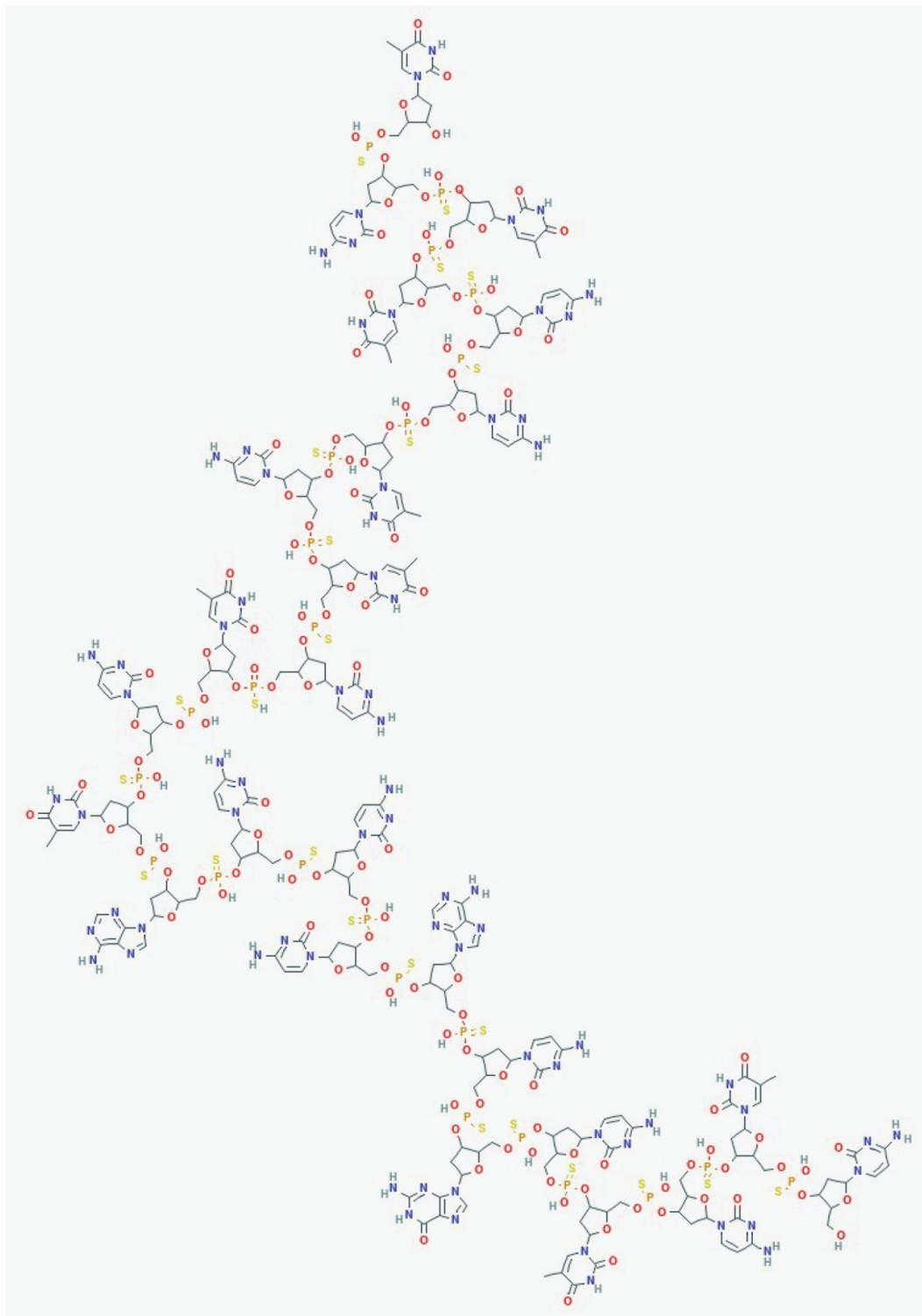


图1.GEM91 (*Trecovirsen*): d(P-Thio)(C-T-C-T-C-G-C-A-C-C-C-A-T-C-T-C-T-C-T-C-C-T-T-C-T)-DNA。

实验

使用不含蛋白酶（核糖核酸酶）的水配制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；由位于美国马萨诸塞州米尔福德的Nitto Denko Avidia定制合成）的储备液，浓度分别为1 mg/mL和0.1 mg/mL。使用体积比为50:50的流动相A:SPE洗脱溶剂组成的试剂稀释储备液，制备LC-MS样品。使用浓度为250 ng/mL的GEM 132作为内标来评估/定量GEM 91。

其他方法请参阅标题为“使用MaxPeak高性能表面技术改善寡核苷酸的SPE-LC-MS分析性能”的应用纪要(<<https://www.waters.com/content/dam/waters/en/app-notes/2020/720007019/720007019-en.pdf><<https://www.waters.com/content/dam/waters/en/app-notes/2020/720007019/720007019-en.pdf>>)。>)。

| 液相色谱条件 | |
|---------|---|
| 流动相A | 1%六氟异丙醇(HFIP) + 0.1% N,N-二异丙基乙胺(DIPEA)的水溶液 |
| 流动相B | 0.75%六氟异丙醇(HFIP) + 0.0375% N,N-二异丙基乙胺(DIPEA)的65%乙腈溶液 |
| 清除溶剂 | 水:甲醇(90:10 v/v) |
| 清洗溶剂 | 乙腈:异丙醇:水:甲醇(25:25:25:25 v/v/v/v) |
| 样品瓶/样品板 | 搭载MaxPeak的QuanRecovery样品板，容积700 μ L（部件号：186009185），带圆形塞预开口硅胶盖垫（部件号：186006332） |
| 色谱柱 | ACQUITY Premier C ₁₈ 寡核苷酸分析专用柱, 1.7 μ m, 2.1 \times 50 mm（部件号：186009484） |
| 柱温 | 50 $^{\circ}$ C |
| 样品温度 | 8 $^{\circ}$ C |
| 进样体积 | 10 μ L |
| 流速 | 0.6 mL/min |

梯度

| 时间 (min) | 流速 (mL/min) | %A | %B | 曲线 |
|----------|-------------|------|------|----|
| 初始 | 0.600 | 95.0 | 5.0 | 6 |
| 3.50 | 0.600 | 75.0 | 25.0 | 6 |
| 4.00 | 0.600 | 10.0 | 90.0 | 6 |
| 4.50 | 0.600 | 95.0 | 5.0 | 6 |
| 5.00 | 0.600 | 95.0 | 5.0 | 6 |

| 数据管理 | |
|--------|---------------|
| 仪器控制软件 | MassLynx 4.2版 |
| 定量软件 | TargetLynx |

| 化合物 | | Xevo TQ-XS串联四极杆 | | | | | Xevo G2-XS QTof MS | |
|-----|---------|-----------------|-----------|-----------|----------|-----------|--------------------|-----------|
| | | 电荷 | 母离子 (m/z) | 子离子 (m/z) | 锥孔电压 (V) | 碰撞能量 (eV) | 电荷 | 母离子 (m/z) |
| OST | 15T | (-8) | 561.5 | 302.8 | 30 | 15 | (-6) | 749.13 |
| | 20T | (-11) | 546.5 | 303.3 | 30 | 20 | (-9) | 667.99 |
| | 25T | (-12) | 627.4 | 302.9 | 40 | 15 | (-10) | 753.12 |
| | 30T | (-11) | 823.1 | 302.9 | 40 | 30 | (-13) | 696.19 |
| | 35T | (-12) | 881.0 | 302.9 | 40 | 25 | (-15) | 704.51 |
| GEM | GEM 91 | (-12) | 647.2 | 319.0 | 30 | 20 | (-11) | 705.88 |
| | GEM 132 | (-10) | 659.3 | 319.0 | 30 | 20 | (-9) | 732.74 |

表1.寡核苷酸分析所用的最终MS条件

结果与讨论

HRMS和MRM方法使用的MS母离子和碎片离子见表1（OST标准品和GEM 91的电荷和 m/z 见表1）。HRMS分析对 m/z 700应用了靶向增强，增加目标质量数附近50-100 Da质量范围的灵敏度。每个平台均使用强度最大/选择性最高的电荷态峰簇，提供了适度的性能优势。通常，电荷包络外有2~3个电荷态峰簇的丰度较高，可以根据背景离子的性质和干扰进行选择。

色谱分离使用ACQUITY Premier BSM系统装配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>>）完成，梯度时间为5分钟（流动相B从5%增加至90%），流动相A为1%六氟异丙醇(HFIP) + 0.1% N, N-二异丙基乙胺(DIPEA)的水溶液，流动相B为0.75%六氟异丙醇(HFIP) + 0.0375% N, N-二异丙基乙胺(DIPEA)的65%乙腈溶液，流速为0.6 mL/min。ACQUITY Premier色谱柱搭载MaxPeak高性能表面(HPS)技术，能够大幅减少非特异性结合并改善回收率和分析检测限。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²。

图2~图4为这些化合物的典型谱图，显示了电荷态峰簇的一般分布（图2）和选定用于监测的电荷态的放大谱图（图3、4）。HRMS可以表征寡核苷酸分子（识别不同的同位素/电荷态），并能选择最适合实现良好定量灵敏度、选择性和准确度的同位素/电荷态。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或同一峰簇内的其他同位素。同样，可以对多个离子同时定量或监测干扰。最后，也是最重要的一点，杂质、代谢物和加合物可能很容易观察，并提供更多关于分析质量的信息，以及关于样品本身潜在干扰和变化的额外信息。

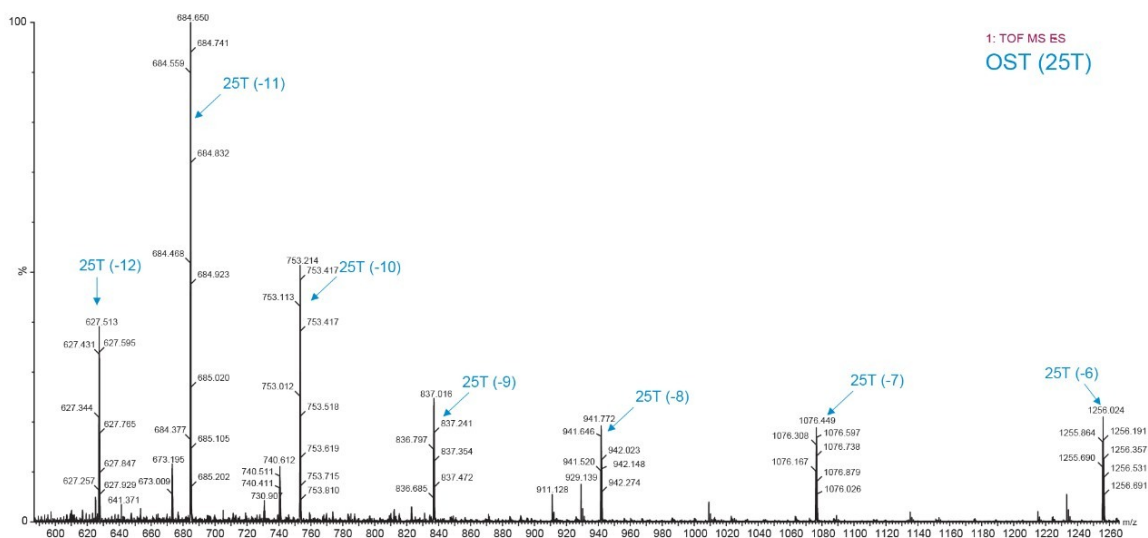


图2.25-mer OST标准品(OST (25T))不同电荷态峰簇的代表性谱图

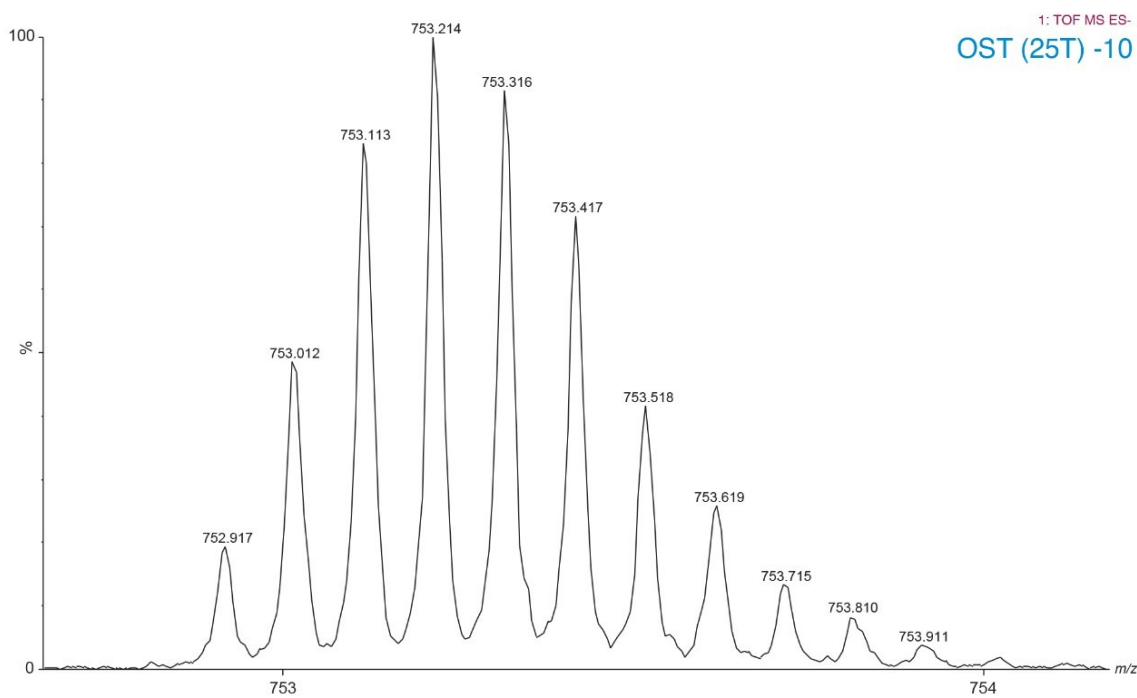


图3.本实验用于OST (25T)定量的 $[M-10H]^{-10}$ 电荷态峰簇的放大图

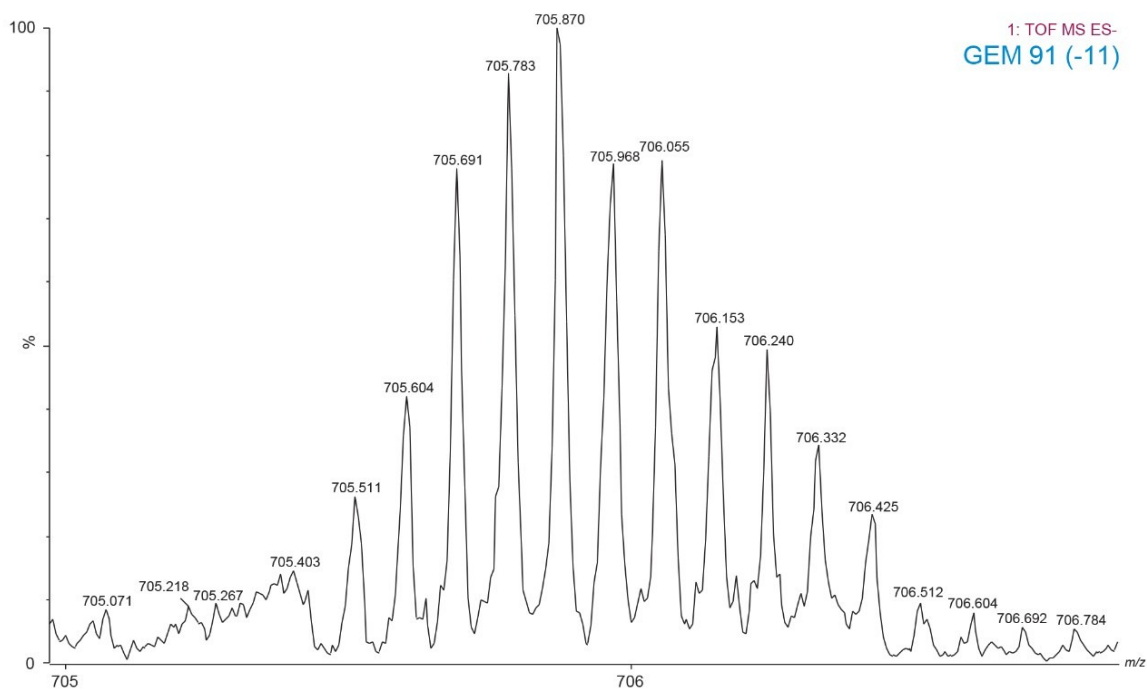


图4.本实验用于GEM 91定量的[M-11H]⁻¹¹电荷态峰簇的放大图

图5a和5b展示了HRMS用于寡核苷酸分析的高质量精度优势，该方法能够提取窄质量数窗口，从而大幅提高分析的选择性。如图所示，使用0.2 Da的质量数提取窗口可获得理想信噪比(S/N)和优异的总体灵敏度。QToF使用户能够选择适合分析和微调选择性的质量数提取窗口(MEW)。图5表明，一般而言，0.2 Da是这些分析物的良好起点，可提供理想S/N。

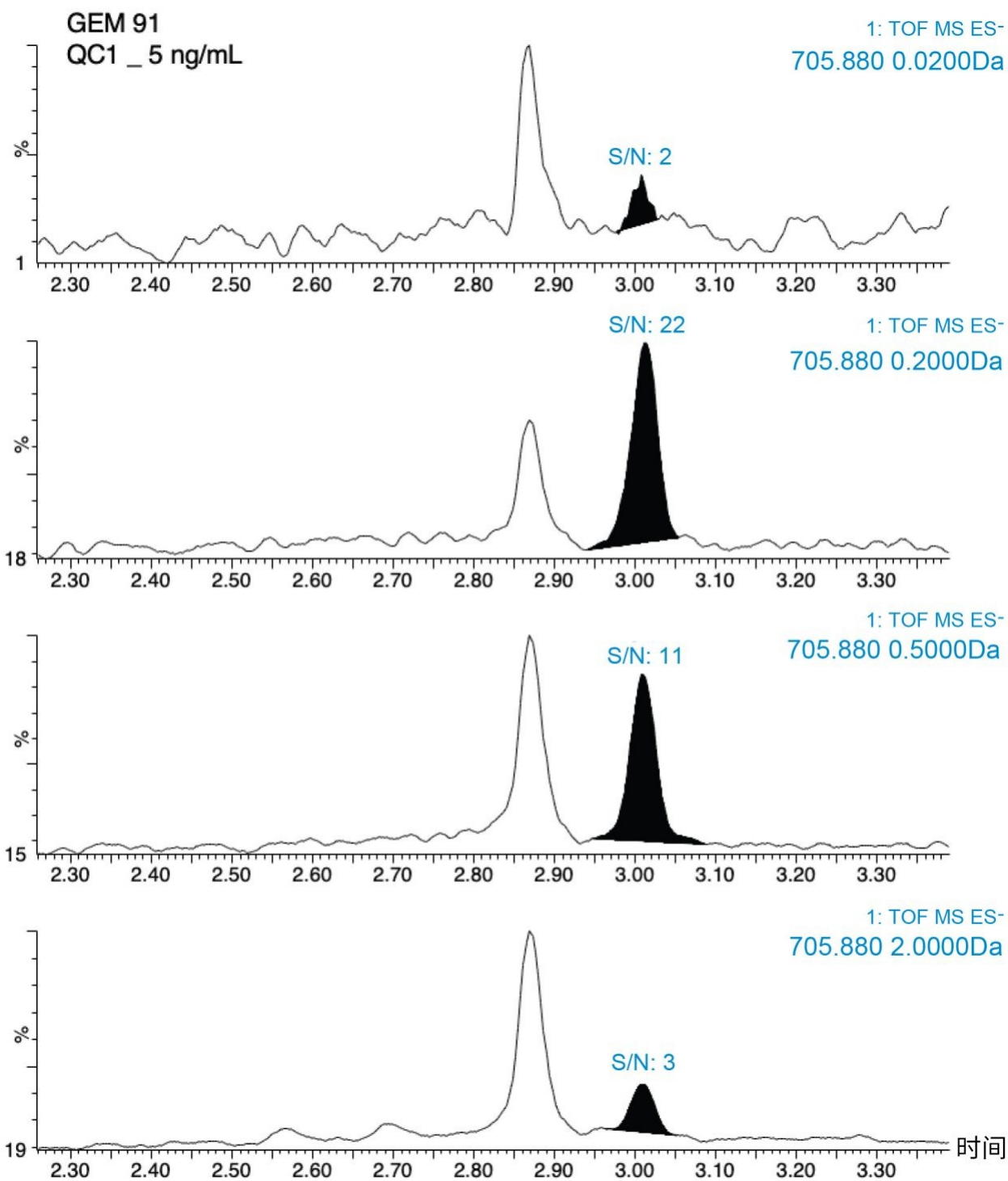


图5a. GEM 91的代表性色谱图，凸显了在Xevo G2-XS QToF MS上使用0.02~2.0 Da内的不同质量数提取窗口时，方

法的灵敏度和专属性提升。

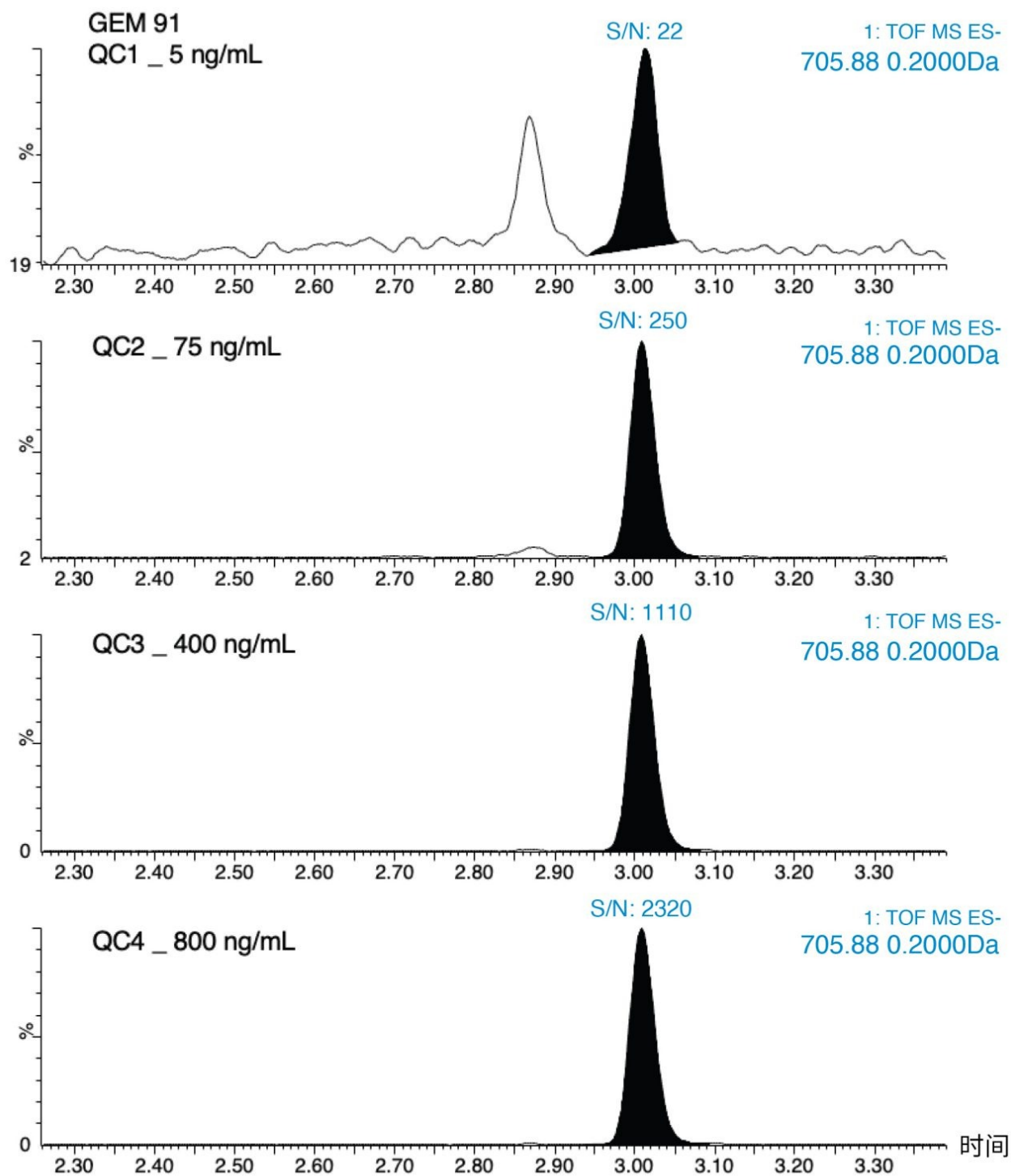


图5b.代表性色谱图，展示了使用0.2 Da的MEW时不同QC水平的灵敏度和选择性。

总体而言，HRMS性能与在Xevo TQ-XS三重四极杆上观察到的MRM定量数据相当。OST (25T)和GEM 91使用HRMS或MRM分析获得的标准曲线性能总结如表2~5所示。两种质谱仪的定量下限(LLOQ)均为1 ng/mL；QTof的动态范围为1-1,000 ng/mL，串联质谱仪的动态范围为1-10,000 ng/mL。校准曲线呈线性， r^2 值>0.99（ $1/x^2$ 加权），所有校准点的平均准确度在88%-108%之间。寡核苷酸OST和GEM 91的质量控制(QC)性能报告见表X，平均准确度在81%-110%之间，CV在0.2%-10.1%之间。

| 编号 | 标准品浓度 (ng/mL) | GEM 91 | | OST (25T) | |
|----|------------------|-----------------|------------|------------------|------------|
| | | 计算浓度 (ng/mL) | 准确度 (%) | 计算浓度 (ng/mL)" | 准确度 (%) |
| S1 | 1 | 0.992 | 99.4 | 0.989 | 98.9 |
| S2 | 2 | 1.91 | 95.6 | 1.99 | 99.3 |
| S3 | 5 | 5.34 | 106.8 | 5.01 | 100.1 |
| S4 | 10 | 10.3 | 102.8 | 10.9 | 108.4 |
| S5 | 50 | 52.4 | 104.7 | 51.9 | 103.7 |
| S6 | 250 | 250 | 100.0 | 256 | 102.4 |
| S7 | 500 | 497 | 99.4 | 508 | 101.5 |
| S8 | 900 | 866 | 96.2 | 833 | 92.6 |
| S9 | 1000 | 931 | 93.1 | 928 | 92.8 |
| | | $r^2 = 0.9972$ | | $r^2 = 0.9961$ | |

表3.在Xevo G2-XS QTof MS上分析GEM 91和OST (25T)的线性动态范围和标准曲线统计数据

| 分析物名称 | 编号 | 标称浓度 (ng/mL) | 计算浓度 (ng/mL) | 准确度 (%) | CV (%) |
|-----------|-----|--------------|--------------|---------|--------|
| GEM 91 | QC1 | 5 | 4.80 | 96.1 | 10.1 |
| | QC2 | 75 | 74.7 | 99.7 | 1.2 |
| | QC3 | 4000 | 3913 | 97.8 | 1.0 |
| | QC4 | 8000 | 7400 | 92.5 | 3.0 |
| OST (25T) | QC1 | 5 | 4.04 | 80.9 | 9.9 |
| | QC2 | 75 | 70.9 | 94.5 | 3.1 |
| | QC3 | 4000 | 4423 | 110.5 | 0.2 |
| | QC4 | 8000 | 7723 | 96.5 | 1.3 |

表4.使用Xevo TQ-XS三重四极杆分析GEM 91和OST得到的QC样品统计数据

| 分析物名称 | 编号 | 标称浓度 (ng/mL) | 计算浓度 (ng/mL) | 准确度 (%) | CV (%) |
|-----------|-----|--------------|--------------|---------|--------|
| GEM 91 | QC1 | 5 | 5.13 | 102.5 | 5.6 |
| | QC2 | 75 | 76.6 | 102.2 | 3.5 |
| | QC3 | 400 | 421 | 105.2 | 1.2 |
| | QC4 | 800 | 764 | 95.4 | 2.9 |
| OST (25T) | QC1 | 5 | 5.20 | 104.0 | 7.8 |
| | QC2 | 75 | 77.3 | 103.1 | 3.7 |
| | QC3 | 400 | 411 | 102.8 | 1.4 |
| | QC4 | 800 | 720 | 90.0 | 1.1 |

表5.使用Xevo G2-XS QToF MS分析GEM 91和OST得到的QC样品统计数据

结论

- Xevo G2-XS QToF MS已被证明是一种灵敏的平台，能够在多种采集模式下生成高质量LC-MS定量数据，为可定量的峰提供多种选择。该平台可通过MEW微调选择性，并选择适合分析的同位素/电荷态。
- 表2~表5的数据表明，Xevo G2-XS QToF MS和Xevo TQ-XS三重四极杆MS用于寡核苷酸分析的灵敏度可以达到1 ng/mL水平，并且不会影响线性、准确度和精密度。
- ACQUITY Premier LC系统装配ACQUITY Premier C₁₈寡核苷酸分析专用柱是提高棘手分析物的回收率和分析检测限的重要工具。
- ACQUITY Premier技术的使用有助于减少金属吸附，确保定量生物分析方法发挥稳定和灵敏的定量性能。

参考资料

1. Jaeah Kim, Babak Basiri, Chopie Hassan, Carine Punt, Erik van der Hage, Cathaline den Besten, Michael G. Bartlett, Metabolite Profiling of the Antisense Oligonucleotide Eluforsen Using Liquid Chromatography-Mass Spectrometry, *Molecular Therapy - Nucleic Acids*, Volume 17, P714–725, September 6, 2019.
2. 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.
3. Kathryn Brennan, Mary Trudeau, Michael Donegan, Paul D. Rainville, 使用MaxPeak高性能表面技术改善寡核苷酸的SPE-LC-MS分析性能, 沃特世应用纪要, [720007019ZH](#), 2020年9月.
4. 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, *Bioanalysis*, Vol.13, No.16, Pages:1233–1244.

特色产品

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

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

Xevo G2-XS QToF四极杆飞行时间质谱仪 <<https://www.waters.com/134798222>>

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

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

720007391ZH, 2021年10月

© 2022 Waters Corporation. All Rights Reserved.