

Agilent RapidFire 联用四极杆飞行时间质谱仪对寡核苷酸进行无需离子对试剂的高通量 HILIC 分析

作者

Peter Rye 博士
安捷伦科技有限公司

摘要

本应用简报介绍了一种使用 Agilent RapidFire 高通量全自动质谱样品前处理系统表征寡核苷酸的高通量、无需离子对试剂的方法。基于 HILIC 的方法实现了 12 秒的分析周期，并表现出很高的稳定性与重现性。通过该方法鉴定出了含量不到目标物的 0.5% 的杂质，获得了几纳摩尔的检测限，以及超过 3 个数量级的线性浓度响应。对九种独特寡核苷酸（包含未修饰和经高度修饰的成分）的分析结果表明，该方法对于具有独特化学性质的样品具有高度通用性。

前言

传统的寡核苷酸 LC/MS 分析方法基于离子对反相 (IPRP) 色谱，因为该方法通常可以实现良好的分离并能在负离子模式下获得良好的 MS 响应。然而，考虑到许多离子对试剂可能会产生记忆效应，从而降低系统在正离子模式下的性能，IPRP 方法对于混合使用的系统来说可能很麻烦，这促使许多实验室寻求无需离子对试剂的替代方法。本研究提出了一种使用 Agilent RapidFire 6545XT MS 系统进行寡核苷酸表征的高通量、无需离子对试剂的方法。该方法采用 Agilent HILIC-Z 树脂和兼容 MS 的乙酸铵流动相，后续无需冲洗或更换硬件即可在系统中运行正离子模式。方法实现了 12 秒的分析周期，以及高质量寡核苷酸表征所追求的可靠性、重现性、动态范围和灵敏度。测试结果还表明，该方法对未修饰和高度修饰的寡核苷酸同样有效，包括反义 (ASO) 和适配体样品。

实验部分

分析方法和样品

RapidFire/Q-TOF 仪器包括一套 Agilent RapidFire 365 高通量全自动质谱样品前处理系统以及一套配备安捷伦喷射流离子源的 Agilent 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF。使用 HILIC 小柱 (H6 型，4 μ L 柱床体积，G9527) 进行在线固相萃取。使用 RapidFire 采集软件 6.1 版和 LC/MS 系统的 MassHunter 采集软件 10.1 版采集数据。本研究使用的 RapidFire 及 MS 方法详细信息如表 1 所

示。LC/MS 级乙腈来自安捷伦。水来自 Milli-Q 系统。配制流动相 A (MPA) 和流动相 B (MPB) 时未调节 pH。本研究中的所有进样量均为 10 μ L。

通过 RapidFire 进样后，样品输送到小柱并使用 MPA 以 1 mL/min 的流速脱盐 5000 ms (使用 20 倍柱体积进行清洗)。然后使用 MPB 以 0.5 mL/min 的流速将脱盐后的寡核苷酸混合物洗脱至 MS 中进行分析，洗脱持续 4000 ms (8 倍柱体积)。得到的色谱峰宽约 6 秒，包含 24 个独特的质谱组分。使用 1 mL/min

的 MPA 重新平衡小柱 500 ms (2 倍柱体积)，之后再引入下一个样品。延长上样/清洗、洗脱或重新平衡的时间后结果改善并不显著 (数据未显示)。优化后的方法 (包括板移动) 维持了 12 秒的分析周期。

采集数据后，RapidFire 软件自动将 MS 数据文件解析为单独的进样文件。在 MassHunter BioConfirm 软件 10.0 版中使用提取离子色谱图和最大熵解卷积技术进行分析。

表 1. 本研究中使用的 RapidFire 和 6545XT MS 方法

RapidFire 条件		
小柱	HILIC (货号 G9527)	
小柱温度	室温	
进样量	10 μ L	
泵 1	MPA = 85% 乙腈 + 15 mmol/L 乙酸铵	1.0 mL/min
泵 2	MPB = 50% 乙腈 + 15 mmol/L 乙酸铵	1.25 mL/min
泵 3	MPB = 50% 乙腈 + 15 mmol/L 乙酸铵	0.5 mL/min
状态 1	吸取样品 (打开传感器)	600 ms
状态 2	上样/清洗 (脱盐)	5000 ms
状态 3	额外清洗	0 ms
状态 4	洗脱 (进样)	4000 ms
状态 5	重新平衡	500 ms
6545XT Q-TOF 条件		
离子极性	双 AJS 负离子模式	
数据存储	两种 (棒状图和轮廓图)	
气体温度	300 $^{\circ}$ C	
干燥气流速	11 L/min	
雾化器气体	35 psi	
鞘气温度	350 $^{\circ}$ C	
鞘气流速	11 L/min	
毛细管电压	3500 V	
喷嘴电压	2000 V	
碎裂电压	175 V	
锥孔电压	65 V	
Oct 1 RF Vpp	750 V	
质量数范围	100–3200 m/z	
采集速率	4 质谱图/秒	

为比较不同分子量寡核苷酸的 MS 信号强度，通过将它们的 Y 轴比例同步取消了缩放。图 2A 显示，随着寡核苷酸分子量增加，HILIC 条件导致 m/z 离子强度显著降低。具体体现在，60 mer 寡核苷酸最主要电荷态的高度约为 18 mer 的 1/25。同样，比较解卷积峰高（图 2B），从 18 mer 到 60 mer，峰高降至原来的 1/25。相比之下，使用 IPRP 时，18、40 和 60 mer 寡核苷酸的解卷积峰高在最低值的 2 倍以内（未显示数据）。

这些一般性观察结果在之前的文献中已有提及。具体而言，Lobue 等人已经证明，随着寡核苷酸的分子量增加，与 IPRP 相比，寡核苷酸的 HILIC 分析可以得到 (1) 更窄的电荷态分布，(2) 最主要电荷态的电荷更低，(3) 最主要电荷态右移。

重现性

为测试 HILIC RapidFire/Q-TOF 方法的重现性，对具有 5' 磷酸酯的 poly-dT 寡核苷酸 (PR7) 重复进样 24 次，并使用 BioConfirm 中的自动分析方法进行解卷积。对于每张谱图，放大所得的解卷积谱图中的最大峰并重叠谱图。结果表明 24 个谱图几乎完全重合，表明每个样品的相对丰度具有出色的重现性（图 3）。重复进样的总离子流色谱图（图 3 插图）显示一致的峰高和峰形，表明除相对信号外，多次进样间的绝对 MS 信号同样十分稳定。

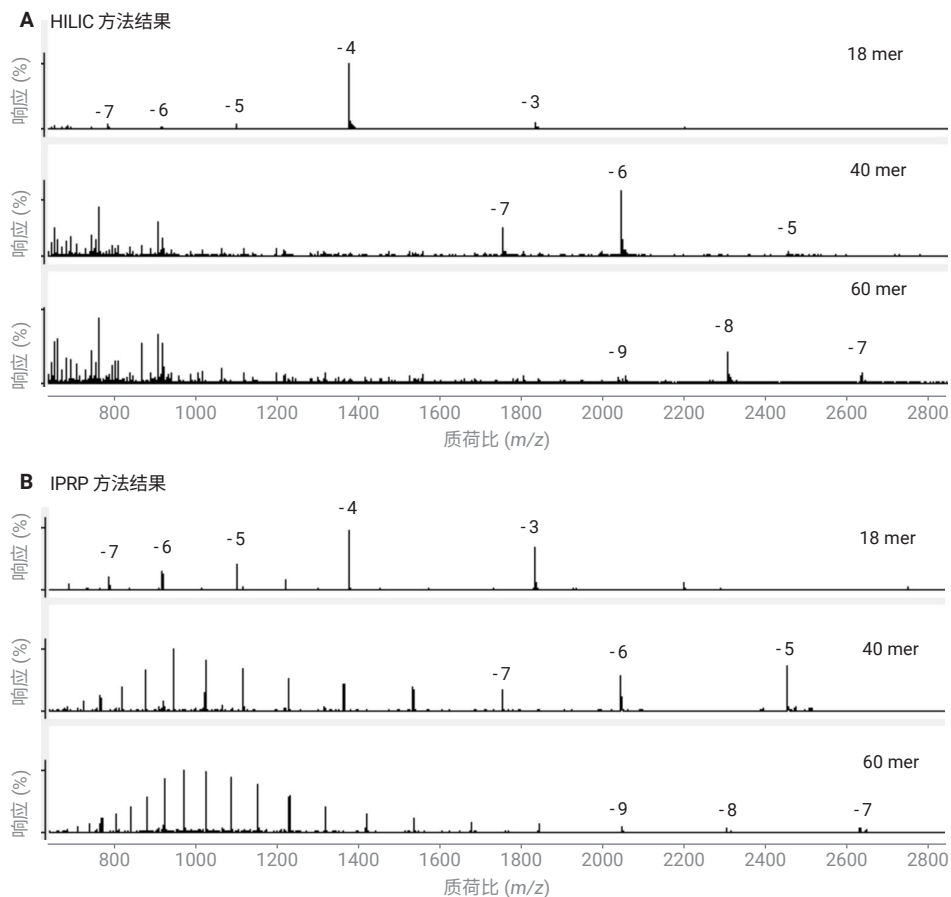


图 1. 通过 HILIC 方法 (A) 获得的 18 mer (上图)、40 mer (中间) 和 60 mer (下图) 的原始 m/z 谱图，以及对比的 IPRP 方法的谱图 (B)。所有谱图均放大了其中最大的峰。针对每种寡核苷酸标记了 HILIC 方法的主要电荷态簇

杂质测定

寡核苷酸样品通常含有大量低丰度杂质，包括截短的合成产物、脱嘧啶和脱嘌呤杂质。因此，用于寡核苷酸表征的分析方法必须具有较宽的动态范围，以进行杂质检测。这种情况对于非色谱方法尤其适用，因为如果未检测到高丰度目标寡核苷酸中的低丰度杂质，则计算出的纯度可能会偏高。

本研究使用的 6545XT 质谱仪可提供多达五个数量级的谱图动态范围。不过仍通过比较几个样品中强度差异较大的相对解卷积峰高评估了该应用的动态范围。

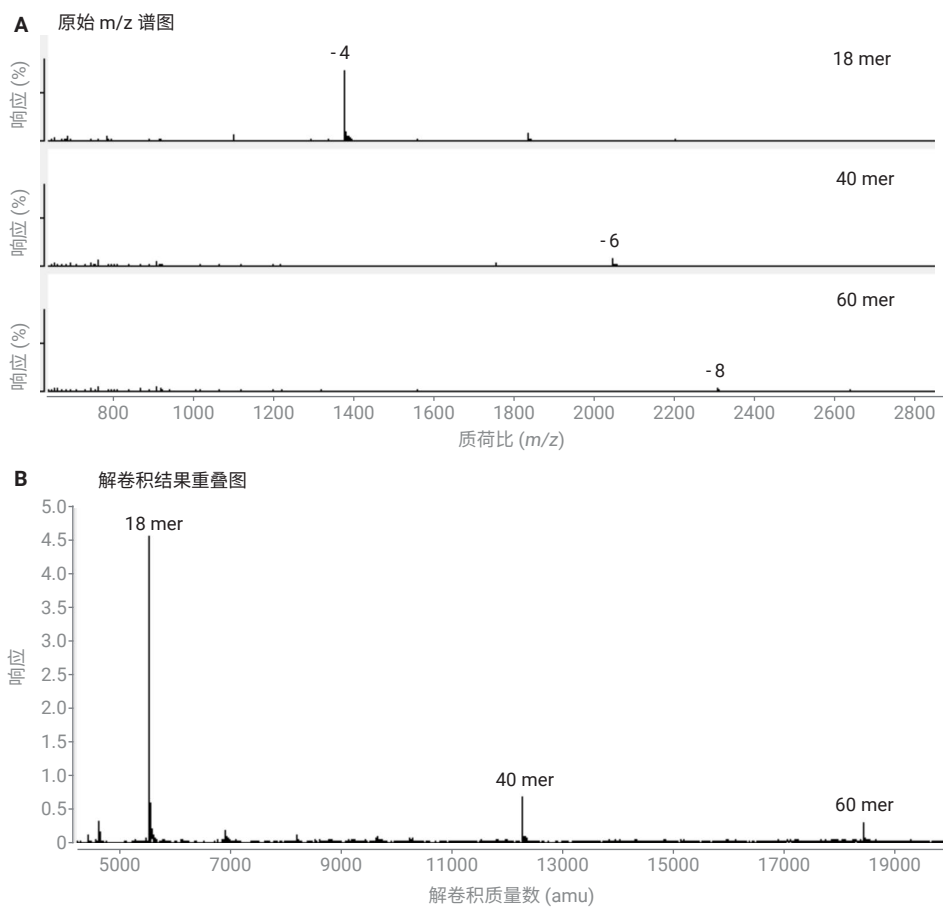


图 2. 比较 18 mer、40 mer 和 60 mer 的 MS 信号强度。Y 轴比例同步的原始 m/z 谱图 (A) 以及重叠的解卷积结果 (B)

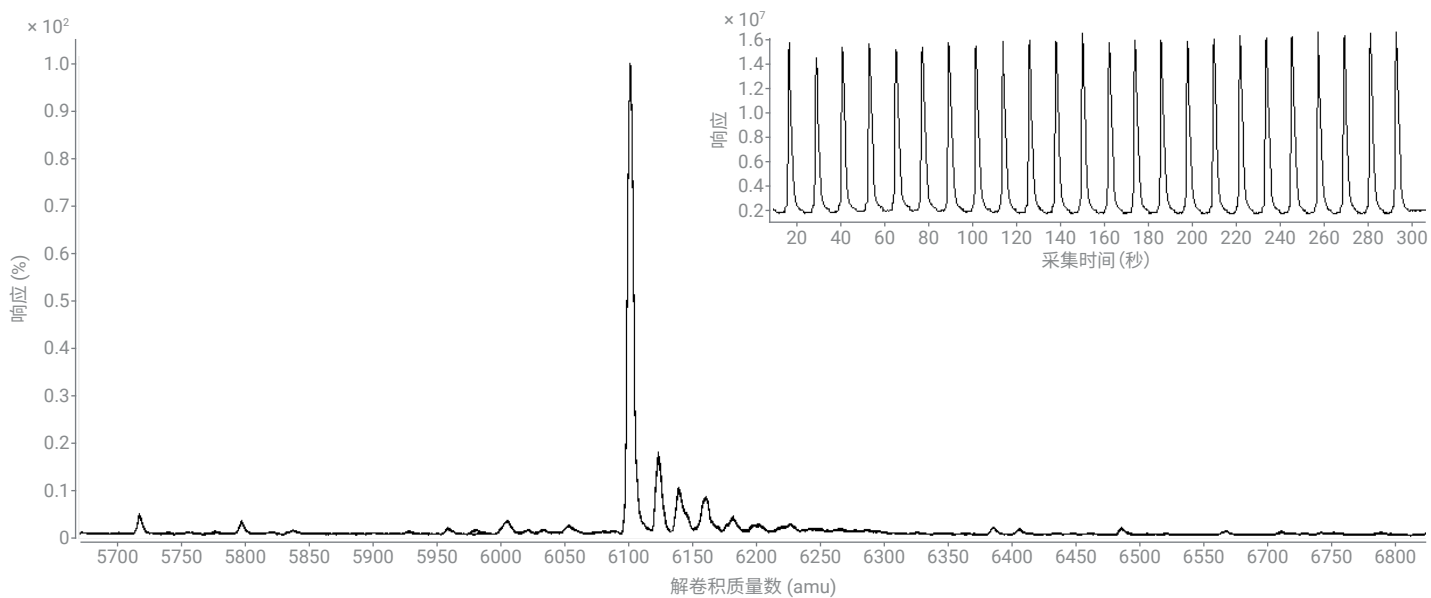


图 3. 24 个重复样的总离子流色谱图 (插图) 和解卷积结果 (主图) 的重现性

图 4 显示了 20 mer DNA 链 (PR1) 10 $\mu\text{mol/L}$ 进样 (柱上为 100 pmol) 的解卷积谱图。丰度最高的峰质量数为 6148 Da, 与目标寡核苷酸的质量数计算值一致。几种常见金属加合物的质量大于目标物, 同时观察到大量质量较低的杂质。仔细查看常见脱嘌呤 (depur) 和截短 (trunc) 杂质的预期质量范围, 发现了多个低丰度峰。根据它们与目标物的质量数差异, 可以确认 5' 截短的 A、气相脱嘌呤的 G、水解脱嘌呤的 G。脱嘌呤杂质的峰高的相对丰度低于目标物的 1%。

在某些情况下, 需要分析质量数相近的寡核苷酸混合物。为评估 HILIC RapidFire/Q-TOF 方法通过质量数分离混合物及其各自成分杂质的能力, 进样 10 $\mu\text{mol/L}$ (柱上为 100 pmol) 含 3' 可变碱基 (C、A 或 G) 的 20 mer poly-dT 寡核苷酸 (PR3)。图 5A 所示的 m/z 谱图显示了多种预期的电荷态, 插图显示了对于 -4 同位素的良好质量数分辨率。图 5B 所示的解卷积结果清楚地显示了三个主峰, 分别与 3'端为 C、A 或 G 的寡核苷酸的预期质量和相对丰度相匹配。此外, 对于以上每种形态, 均观察到 $n-1$ 和 $n-2$ 杂质。3 种形态的 5'-T 丢失导致峰减小 304 Da, 3 种形态的 5'-TT 丢失导致峰减小 608 Da (304 + 304)。对于具有 3' G 的寡核苷酸, 比较对应于目标物 (2.5E5 响应) 和丢失 5'-TT 的杂质 (0.75E3 响应) 的峰高, 结果表明尽管样品和谱图比较复杂, 但很容易观察到 0.3% 杂质。

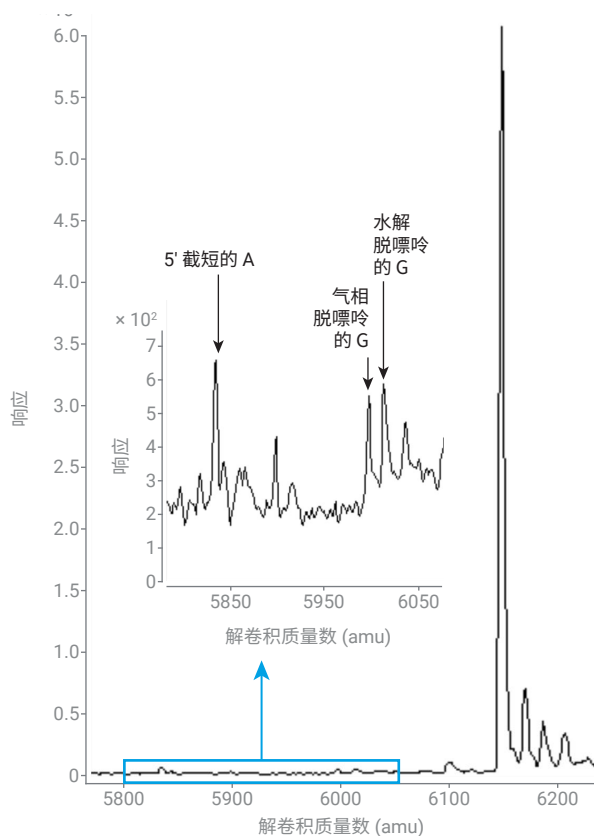


图 4. PR1 中杂质的鉴定结果

该实验中另一个值得注意的结果是, poly-dT 寡核苷酸的谱图具有相对广泛的电荷态分布。根据上面的结果和讨论, poly-dT 寡核苷酸似乎不容易实现二级结构, 否则会减少在 m/z 谱图中观察到的电荷态。

方法灵敏度、线性和残留

为评估 HILIC RapidFire/Q-TOF 方法的灵敏度和线性, 对 8 种浓度 (以及 0 浓度点) 的 PR7 进行了三次重复进样。使用 MPA 从 1250 nmol/L 开始两倍连续稀释至 9.7 nmol/L。在各重复进样之间进样

零浓度样品, 从而研究该范围内各个浓度下的残留情况。使用两种方式分析总共 54 次进样的结果数据。首先, 对于靶向 MS 测量, 生成 -4 电荷态 ($m/z \sim 1524$) 的提取离子色谱图并进行平滑和积分。对每种浓度的重复进样峰面积进行平均, 相对于浓度绘图。在该图上使用误差线来表示数据的标准偏差, 如图 6A 和 6B。其次, 对于图 6C 所示的非靶向解卷积结果, 生成 -4 电荷态 ($m/z \sim 1524$) 的提取离子色谱图并进行平滑和积分。然后提取积分峰的平均 m/z 谱图并进行解卷积。

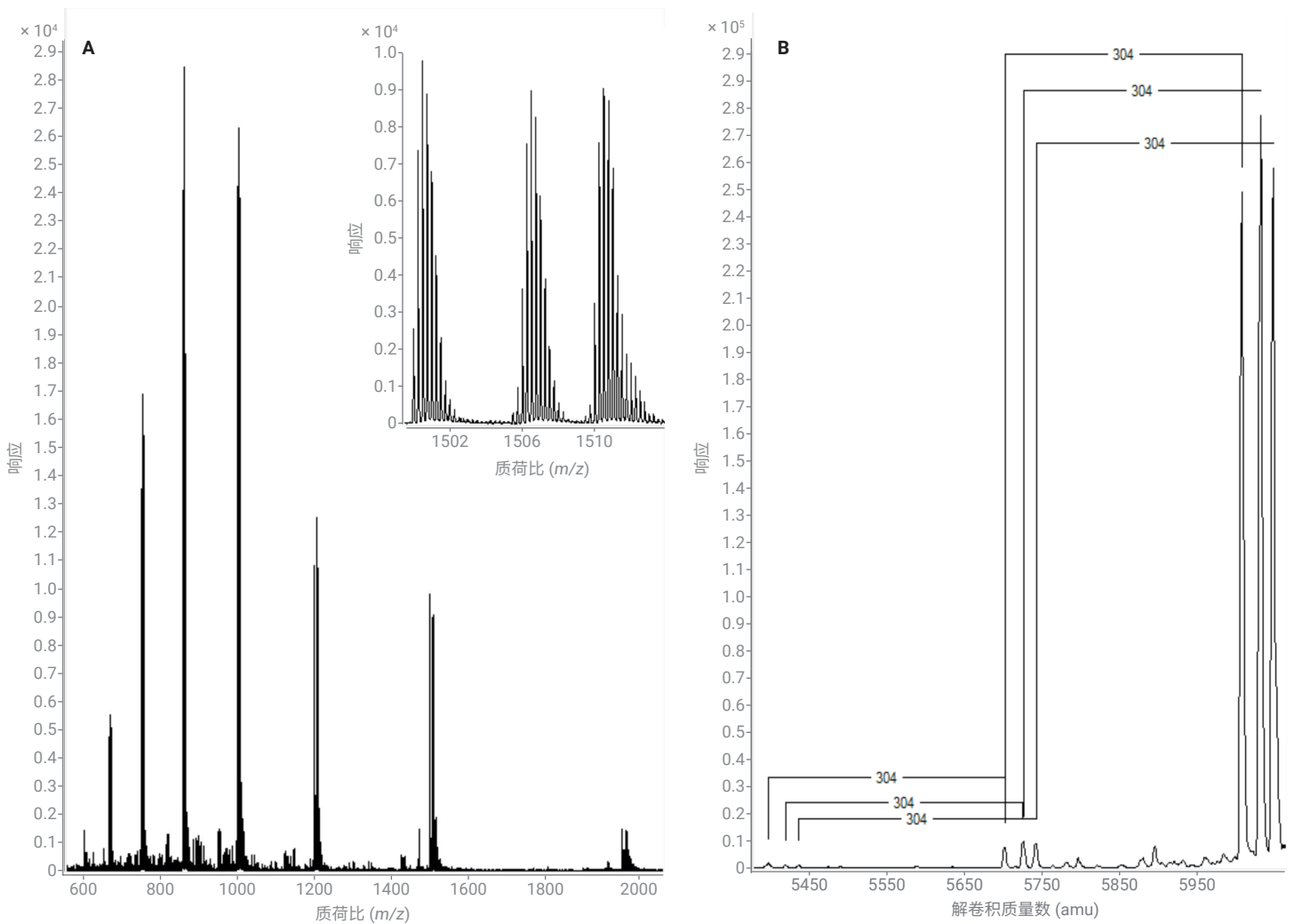


图 5. PR3 中低丰度杂质的鉴定结果。原始 m/z 谱图 (A) 和解卷积结果 (B)

图 6A 显示，本研究使用的寡核苷酸在所研究的九种浓度范围内具有线性响应，最佳线性拟合 $R^2 = 0.9988$ 。空白样数据显示斜率约为 2.8，而样品的斜率约为 192，表明在整个浓度范围内残留小于 1.5%。在随后的实验中（数据未显示），当选择 RapidFire 的 blank injection in between each sample（各样品间进行一次空白进样）功能时，该值降至 0.1% 以下。然而由于每个样品之间进行一次空

白进样会使分析周期加倍，并且在中间没有空白样的情况下残留同样符合可接受标准，因此认为无需额外的空白进样。观察低浓度数据（图 6B），0 和 9.7 nmol/L 浓度的 AUC 具有明显的差异。9.7 nmol/L 时信噪比大于 4，在 19.5 nmol/L 时接近 6，在 39 nmol/L 时为 28。虽然 IPRP 条件下浓度响应的斜率要大得多（2898，数据未显示），但信噪比与 HILIC 条件下几乎相同。

为了测试以非靶向方式检测目标寡核苷酸的局限性，对每种浓度的谱图进行了解卷积。低浓度进样的代表性结果如图 6C 所示，可以轻松从小两位数的 nmol/L 样品中确定目标峰。这些结果表明，与预期一致，虽然靶向提取实现了更高的检测灵敏度，但非靶向解卷积对于鉴定低浓度样品中的目标物仍然非常有效。

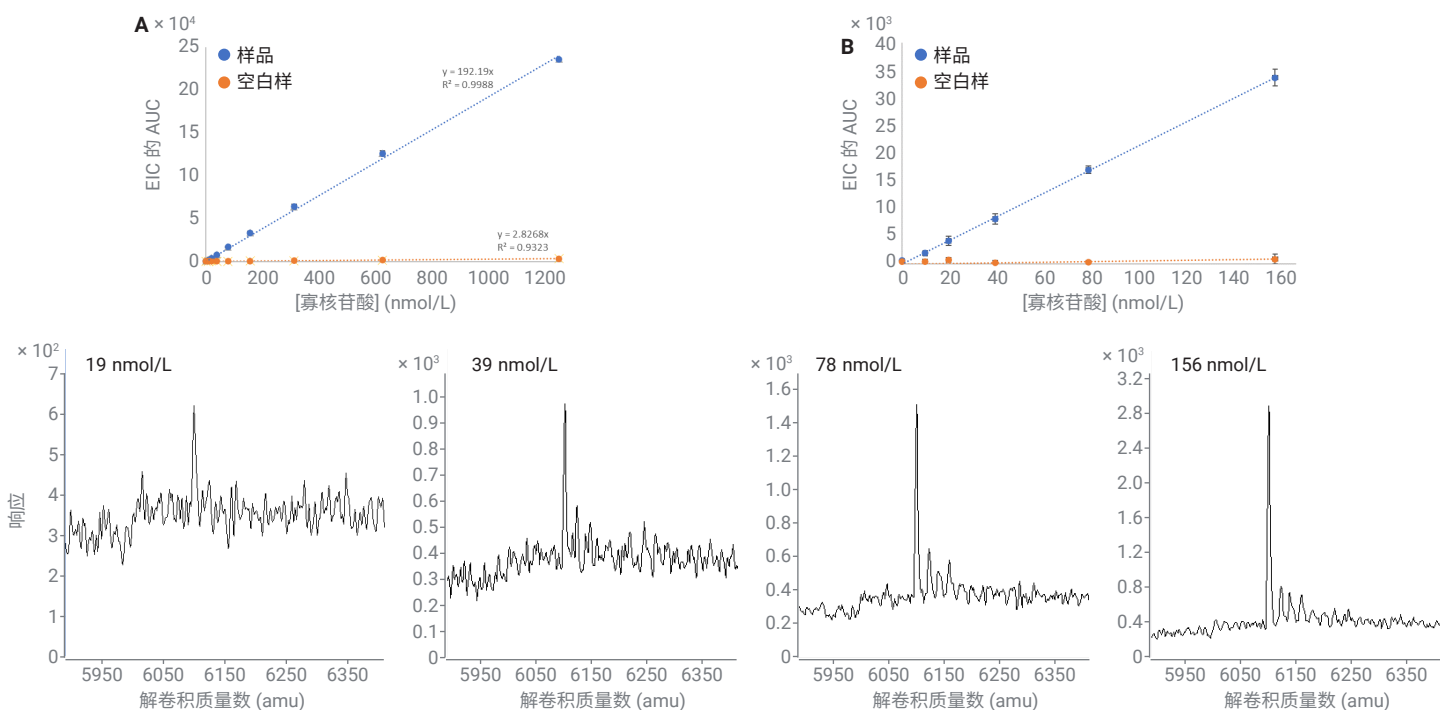


图 6. PR7 的浓度响应，用于评估方法灵敏度、线性和残留。信号相对于浓度作图 (A)，低浓度范围的放大图 (B) 和解卷积结果图 (C)

其他研究人员比较了 HILIC 与 IPRP 方法的灵敏度，报告结果不一。Lobue 报告称，与 IPRP 相比，HILIC 条件下的 MS 信号响应更高^[2]，其原因在于 HILIC 条件下流动相的有机物含量更高，可实现更有效的去溶剂化。在其他文献中，与 IPRP 相比，HILIC 条件下目标峰高更低，原因在于 Na 和 K 加合物离子含量增加。因此需要进一步的研究来比较这些技术对多种不同分子量和化学性质的寡核苷酸的分析灵敏度，以控制可能影响结果的各种采集和分析参数。

方法通用性

寡核苷酸样品的化学性质可能存在很大差异。为评估 HILIC RapidFire/Q-TOF 方法对具有不同碱基组成、不同类型连接子和不同修饰的寡核苷酸的适用性，采用优化方法采集了大量样品的数据。这些 10 $\mu\text{mol/L}$ 样品包括 DNA 链（含有磷酸二酯连接子和 5'磷酸），ASO（含有硫代磷酸酯连接子和 2-甲氧基乙氧基结构单元）和适配体（含有反式 T，2-甲氧基乙氧基和氟化碱基）。放大获得的解卷积谱图的最大峰并相互重叠。图 7 所示的结果显

示，每个样品都有高丰度的目标峰，且具有出色的质量数准确度。还可以确定每个样品的常见杂质（未显示数据）。这些结果表明，HILIC RapidFire/Q-TOF 方法可以为 18-28 mer 范围内各种类型和化学性质的寡核苷酸提供高质量的数据。

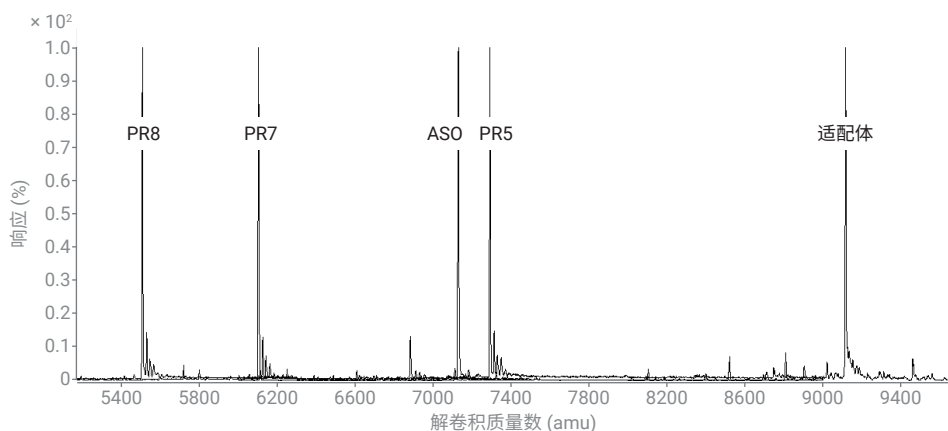


图 7. 使用 RapidFire MS 获得的各种化学性质的寡核苷酸的解卷积结果叠加图 (无离子对试剂)

结论

Agilent RapidFire 高通量全自动质谱样品前处理系统与 Agilent 6545XT 质谱仪相结合, 在数据采集期间将每个样品的分析周期维持在 12 秒, 从而实现高通量寡核苷酸表征。采集方法包括之前介绍的 IPRP 条件^[1], 以及本文介绍的无需离子对试剂的 HILIC 条件。HILIC 方法使用标准安捷伦产品, 并且无需调整流动相的 pH 值, 易于设置和使用。

HILIC 方法具有高质量寡核苷酸表征所需要的稳定性、重现性、动态范围和灵敏度。对各种寡核苷酸的分析结果表明, 对高度修饰的 ASO 和适配体样品也具有十分出色的方法性能。尽管 HILIC 方法通常用于大小约 25 mer 的寡核苷酸, 但对高达 60 mer 的寡核苷酸也可获得高质量数据。

参考文献

1. Rye, P. T.; Yang, Y. High-throughput Mass Spectrometry of Synthetic Oligonucleotides: A Comparison of Data from Fast LC and RapidFire Methods. *ASMS* **2020**. TP 434
2. Lobue, P. A. *et al.* Oligonucleotide Analysis by Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography-Mass Spectrometry in the Absence of Ion-Pair Reagents. *J. Chromatogr. A* **2019**, 1595, 39–48
3. Huang, M.; Xu, X.; Qiu, H.; Li, N. Analytical characterization of DNA and RNA oligonucleotides by hydrophilic interaction liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* **2021**, 1648, 46–2184

www.agilent.com

DE54527408

本文中的信息、说明和指标如有变更, 恕不另行通知。

© 安捷伦科技 (中国) 有限公司, 2022
2022 年 6 月 22 日, 中国出版
5994-4945ZHCN

查找当地的安捷伦客户中心:

www.agilent.com/chem/contactus-cn

免费专线:

800-820-3278, 400-820-3278 (手机用户)

联系我们:

LSCA-China_800@agilent.com

在线询价:

www.agilent.com/chem/erfq-cn

