

使用用于 OpenLab CDS 的安捷伦寡核苷酸分析加速器分析单链寡核苷酸的纯度、含量和杂质

作者

Brian Rivera
安捷伦科技有限公司

前言

治疗性合成寡核苷酸的质量控制面临着诸多挑战，包括样品纯度检测、标示量/含量测定以及杂质定量分析。传统的 HPLC 方法采用 260 nm 紫外检测，其灵敏度和特异性往往难以满足质量控制 (QC) 检测的要求。采用质谱仪等选择性更高的检测器是满足 QC 检测需求的一种可行方案。虽然 LC/MS 方法已成为寡核苷酸表征的主要方法，但许多高分辨精确质量检测器在质控等常规检测环境中可能缺乏足够的稳健性。此外，质谱操作、数据分析和数据解析通常需要较高的专业技术门槛。

相比之下，单四极杆检测器是一种更实用的方法，它具有足够高的选择性和灵敏度，可实现寡核苷酸的纯度、含量和杂质分析。Agilent InfinityLab LC/MSD XT 凭借在全扫描模式下的宽质量范围和高灵敏度，完全满足 LC/MS QC 的要求。

Rentel 等人^[1]的研究表明，LC/MSD XT 经过验证后，可用于寡核苷酸的 QC 批次放行。然而，当前仍然存在数据分析复杂、步骤多的问题，通常需要提取多组提取离子色谱图并进行手动积分。在色谱数据系统 (CDS) 中执行这些操作，同时又要确保合规，整个流程可能会非常耗时。由分析人员手动录入数据还存在较高的出错风险，进而延误决策。

本技术概述将介绍用于 Agilent OpenLab CDS 的寡核苷酸分析加速器 (Oligo Analysis Accelerator, OAA)。该软件插件作为 OpenLab CDS 的前端数据分析模块, 利用内置技术控制功能来确保满足数据可靠性和合规性要求。通过在专用的用户界面中进行谱图叠加、积分和计算, 大大简化了数据分析流程。这不仅可以节省完成任务所需的时间, 还可以提高数据质量。

离子对反相液相色谱质谱法 (IP-RPLC) 在寡核苷酸分析中的应用情况

虽然 IP-RPLC 在寡核苷酸分析中的应用已非常成熟, 但它也存在一些不足之处。寡核苷酸是带负电荷的短链低聚物, 在进入质谱检测器前的电喷雾解吸过程中会产生多重电荷分布包迹。当存在共洗脱杂质时, 目标全长产物与其他离子之间会产生谱图重叠, 如果不使用高分辨质谱检测器和高度优化的液相色谱方法, 数据分析就会变得异常复杂。即使具有足够高的色谱分离度和质谱分辨率, 母体寡核苷酸与杂质之间极高的化学相似性仍会给分析带来巨大挑战, 尤其是在常规检测环境中, 方法还必须兼顾稳健性以及准确性、重现性和特异性。

Rentel 等人开发的 LC/MS 方法成功避免了上述诸多问题。首先, 通过统一的流动相/直接进样溶剂条件 (即乙酸三丁胺的水和乙腈溶液), 结合相对温和的电离条件, 使电荷分布包迹

主要为四电荷态。由于仅观测单一电荷态, 因此可以对化学性质相似的共洗脱杂质进行测定和定量。研究证明, 这种方法具有良好的重现性, 可实现 0.2% 的杂质阈值。

虽然流动相中的乙酸三丁胺 (TBAA) 能够大大减少其他电荷态, 但它对产物杂质的色谱分离效果较差。此外, TBAA 还是一种强离子对试剂, 需要高浓度的乙腈进行洗脱。由此产生的高有机物含量电喷雾电离液滴可确保足够高的检测灵敏度。任何与目标物共洗脱的杂质, 只要超过预设阈值即可被检出。通过提取这些超阈值的 m/z 值 (已知或未知杂质) 生成提取离子色谱图 (EICs), 然后进行积分定量。

图 1 简要介绍了分析工作流程。每一次样品或标准品进样后, 先对 UV 信号进行积分, 根据峰面积确定 UV 纯度百分比。然后提取 UV 主峰对应的质谱图, 筛选超出预设阈值的 m/z 值。通过对 EICs 进行积分, 完成定量分析。

该分析工作流程相较于其他 QC 方法具有若干独特之处。例如, 基于 UV 和 MS 检测的四点校准曲线。UV 峰面积采用简单的线性相关性进行定量, 这是测定原料药和成品药含量或浓度的常用方法。然而, 在 MS 校准中, 需要将全长产物 (FLP) 和单氧化的 FLP (FLP, $P=O$) 的峰面积相加进行计算。这是因为这两种离子的洗脱曲线几乎相同, 相较于与其他部分分离的杂质, 它们具有相似的电离效率。由于硫代磷酸酯是治疗性

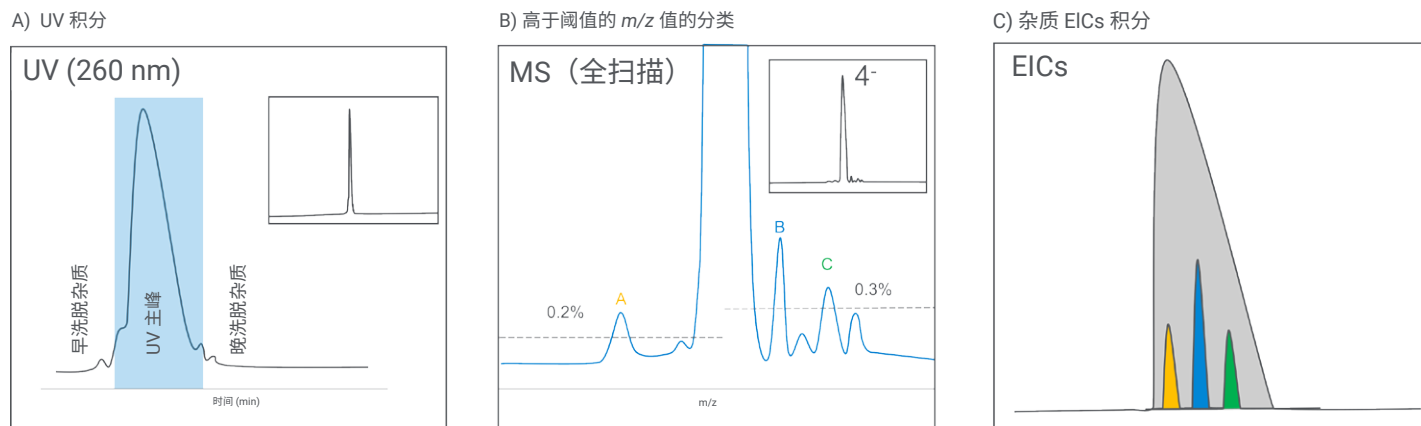


图 1. A) 通过早洗脱杂质和晚洗脱杂质确定主峰积分范围, 计算 UV 纯度。B) 利用主峰的全扫描质谱图对任何高于阈值 (FLP m/z 之前为 0.2%, FLP m/z 之后为 0.3%) 的杂质进行分类。C) 然后对每种杂质的 EICs 进行积分, 测定标准品或样品的 MS 纯度

寡核苷酸中普遍存在的一种修饰，因此单氧化产物是一种常见的杂质，需要进行准确定量。但需要注意的是，采用 FLP 和 FLP (P=O) 的峰面积之和会导致非线性响应，对于高浓度标样尤为明显。因此，需要使用二次或二阶多项式曲线进行拟合。

此外，每个待测样品都必须在两种不同的 MS 离子源条件下进行分析。由于四电荷态分析需采用软电离条件，可能导致形成 FLP 加合物，当样品中存在近同量异位杂质时，这一问题尤为突出。因此，还需要运行“严苛”电离条件来确认是否存在加合物。也就是说，对于近同量异位杂质，如果严苛条件下的离子响应值仍高于阈值，则判定该离子为杂质，并提取 EICs 进行定量分析。

表 1 为进样序列表示例，其中包含使用“工作标准溶液”(WSS)的四点校准溶液以及针对每个样品的“标准/严苛”检测要求。表 2 则为针对采集方法的 LC 和 MS 参数设置建议。

此方法的最后一个注意事项是，由于采用独特的流动相体系，双链寡核苷酸（如变性条件下的 siRNA）无法实现有效分离，因为正义链和反义链会共洗脱。此外，由于 Agilent InfinityLab LC/MSD XT 的扩展质量数范围上限为 m/z 3000，因此-4 电荷态的分析模式将限制该方法仅适用于不超过 40 mer 的寡核苷酸分子。

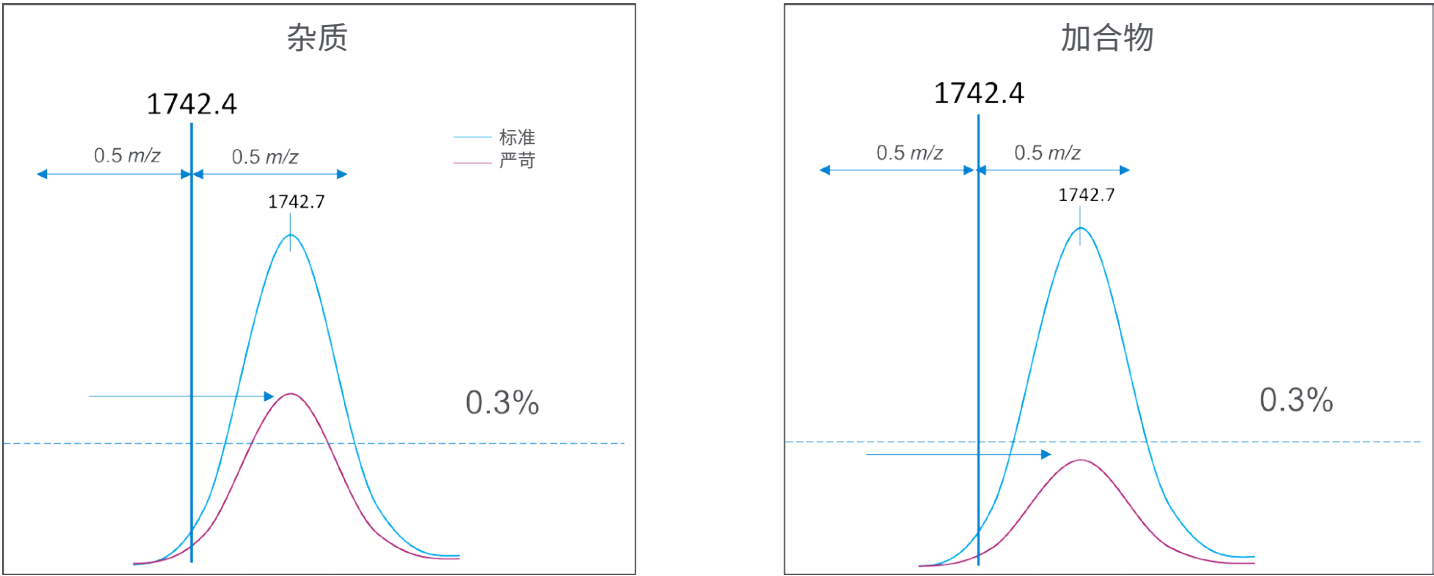


图 2. 由于需要采用软电离，因此需要两种不同的 MS 采集方法来确定高于阈值的离子是杂质还是加合物。如果离子在严苛电离条件下仍超过阈值，则将其视为杂质。否则，将该离子视为加合物，不用于定量分析

表 1. Agilent OpenLab CDS 中安捷伦寡核苷酸分析加速器采集方法的进样列表。至少需要一个空白，但通常会运行三个空白以确保系统活化和平衡到位。使用三个 QC 标样，其中一个为校准曲线的第三个点。样品采集需要使用两种方法（标准和严苛），建议在“严苛”条件下进行一次空白进样。OpenLab CDS 采集过程中会使用标签

样品名称	样品类型	标签	进样量 (µL)	采集方法
空白	空白		25	标准
空白	空白		25	标准
空白	空白		25	标准
WSS, 10 µL	校准标样		10	标准
WSS, 20 µL	校准标样		20	标准
WSS, 25 µL	校准标样	QC	25	标准
WSS, 30 µL	校准标样		30	标准
WSS	QC	QC	25	标准
样品（标准）	样品	S1	25	标准
空白	空白		25	严苛
样品（严苛）	样品	H1	25	严苛
空白	空白		25	标准
WSS	QC	QC	25	标准

表 2. LC 和 MS 推荐参数。乙酸三丁胺 (TBAA) 可确保电荷态更加单一，大多数单链寡核苷酸将形成-4 电荷态。对于大多数寡核苷酸，扫描范围设置为目标 FLP $m/z \pm 150$ 。标准和严苛 MS 条件在干燥气流量和气体温度方面都有所不同，严苛条件下的干燥气流量和气体温度更高，以尽可能减少加合物的形成。但这会导致源内碎裂（主要为脱嘌呤），因此仍然需要使用标准条件，尤其是在定量分析时

HPLC	Agilent 1260 Infinity II LC/Agilent 1290 Infinity II LC
色谱柱	Agilent AdvanceBio 寡核苷酸色谱柱，2.1 × 150 mm
流动相	A: 10% ACN、5 mM 乙酸三丁胺、1 µM EDTA B: 80% ACN、5 mM 乙酸三丁胺、1 µM EDTA
流速	0.25 mL/min
柱温	50 °C
UV	二极管阵列检测器，260 nm
梯度	22 分钟内，B 从 45% 升至 80%
MSD	G6135C
离子源	ESI
干燥气流量	12.0 L/min（标准条件） 13.0 L/min（严苛条件）
气体温度	260 °C（标准条件） 350 °C（严苛条件）
雾化器压力	25 psig
毛细管电压	4000 V
模式	负离子
扫描	FLP, m/z -150 至 + 150 例如，对于 m/z 1728.1, 1578.1-1878.1，轮廓图 (Profile) 模式
扫描时间	1149 ms（标准条件） 975 ms（严苛条件）
碎裂电压	100 V
增益因子	2

寡核苷酸分析加速器软件和架构

除了需要独特的流动相和使用两种不同的 MS 离子源条件外，寡核苷酸分析的 LC/MS 采集工作流程相对来说比较简单。然而，在标准色谱数据系统中执行该分析工作流程可能非常耗时，因为过程中需要多次手动进行信号叠加并且需要手动抄录数据。虽然现有软件模块能够执行该工作流程，但可能无法满足 21 CFR Part 11 和其他法规规定的可靠性和合规性要求。

为此，安捷伦开发了 OAA，其采用 Web 客户端 (Angular)，通过“RESTful APIs”与 OpenLab CDS 通信。这使得 OAA 可以作为 OpenLab 内合规环境的前端，确保实现用户访问控制、变更控制/版本控制，以及通过审计追踪和日志文件实现可追溯性。

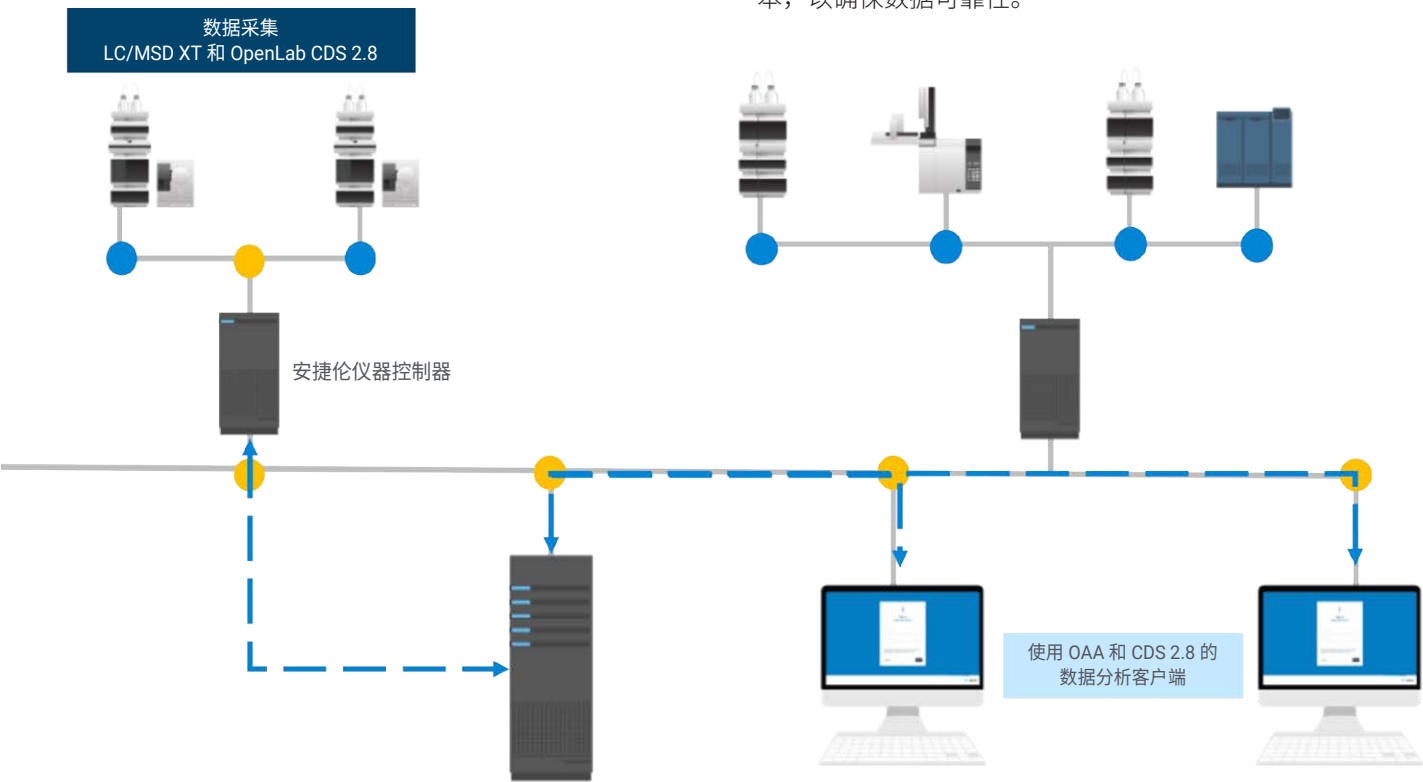


图 3. 用于 OpenLab CDS 的安捷伦寡核苷酸分析加速器的客户端-服务器拓扑结构。使用连接安捷伦仪器控制器 (AIC) 的分布式 Agilent InfinityLab LC/MSD XT 采集数据。然后将数据存储在 Agilent OpenLab 服务器上。之后，OAA 客户端可通过 DA API 访问数据，并允许更改处理方法。对处理方法的任何更改都会保存在 OpenLab 内相应的日志文件和审计追踪中

图 3 展示了 Web 客户端在 OpenLab CDS 客户端-服务器拓扑结构中的应用方式。简而言之，LC/MSD XT 采集数据后，经优化的处理方法确保将积分设置、谱图提取设置和元数据准确填入相应字段。采集结果集的原始版本将安全存储于服务器指定位置。

寡核苷酸分析加速器的分析工作流程

本节重点介绍 OAA 应用程序中的一些关键软件功能，指导用户顺利完成纯度、含量和杂质分析工作流程。该工作流程包括以下步骤：

1. 项目设置、处理方法、数据采集
2. 数据选择
3. 系统适用性
4. 离子分类
5. 积分
6. 总结

图 4 显示了各工作流程对应的数据系统。值得注意的是，一旦开始数据选择步骤，系统将立即保存 OAA 结果集的新版本，以确保数据可靠性。



图 4. 使用用于 OpenLab CDS 的安捷伦寡核苷酸分析加速器对寡核苷酸进行纯度、含量和杂质分析的完整分析工作流程。项目配置和数据采集分别在 Agilent OpenLab 控制面板和采集软件中进行。数据分析在安捷伦寡核苷酸分析加速器中进行。报告和批准在 Agilent OpenLab 数据分析软件中进行

项目设置、采集和处理方法

在将结果集导入 OAA 进行数据处理之前，用户必须完成项目配置。这包括项目文件夹设置、优化处理方法以及数据采集。这三个步骤均在 OpenLab 控制面板和 CDS 中执行。

在 Agilent OpenLab 控制面板中应为每种分子配置单独的项目文件夹。“样品自定义参数”用于输入报告原料药和药物含量测定结果所需的相关元数据，包括样品前处理信息、卡尔费休水分测定数据、样品批号等。此外，通过配置处理方法能够大大减少网络应用程序中的手动积分和数据输入工作量。该配置过程包括根据预期色谱性能对 UV 信号和 EICs 进行峰积分优化。

完成项目文件夹和处理方法的配置后，分析人员即可开始设置数据采集。将样品和参比标样信息输入序列表中，并可为每个样品分配处理方法。其中尤为关键的是需要针对样品的标准和严苛电离条件建立两套不同的采集方法，这些离子源参数设置对于准确测定加合物和杂质至关重要。

数据选择

数据选择是 OAA 在网络应用程序中执行的第一个步骤。用户需要使用 OpenLab 登录凭据登录网络门户，因为这一步用户可以设置的参数取决于该用户在控制面板中分配的用户角色与权限。随后可以设置项目级参数，包括导入离子列表，它是一个包含所有已知离子或 m/z 值的 .CSV 文件。此外，还需输入系统适用性要求和样品参数，以及原料药和成品药的相关参数。

完成项目级参数设置后，用户将进入初始设置阶段。如有需要，用户可以在结果集层级进行相关参数调整。或者，可以在系统适用性测试之前对结果集的元数据和输入内容进行复核。

系统适用性

系统适用性测试 (SST) 涉及几种不同的计算，必须对 UV 和 MS 信号执行这些计算。使用 Microsoft Excel 工作表或 OpenLab CDS 中的自定义报告来执行 SST 可能非常耗时。因此，OAA 网络应用程序将使用结果集中已处理的数据自动进行 SST 计算。

但用户可能需要在网络应用程序中执行一个关键步骤，即对 UV 主峰积分。这一步将确定工作标准溶液的 UV 纯度，并用于生成 UV 校准曲线。

OAA 算法按以下方式确定 UV 主峰的积分范围：

根据离子列表中所有已知杂质的保留时间确定最早洗脱的杂质 (EEI)。然后将 EIC 积分起点作为 UV 主峰积分起点。根据离子列表中所有已知杂质的最晚保留时间确定最晚洗脱杂质 (LEI)，然后使用 EIC 积分终点时间确定 UV 主峰积分终点 (图 5)。EEI 和 LEI 积分点和保留时间均通过工具自动调整，以校正 UV 和 MS 偏移，用户无需手动执行任何计算。

但需注意，用于确定主峰保留时间起点的方法存在一定差异，即一些方法直接采用 $n-2$ 拐点的垂线确定起点。在这种情况下，用户只需拖动 OAA 界面中的虚线，根据需要进行调整即可。

完成 UV 主峰积分后，用户可以查看系统适用性测试结果（包括校准曲线和方程），确认无误后即可进入工作流程的下一步。任何不符合标准的参数，都会被适当标记。用户可以选择继续测试、返回 UV 积分步骤调整设置，或返回 OpenLab CDS 数据分析软件进一步审查数据。

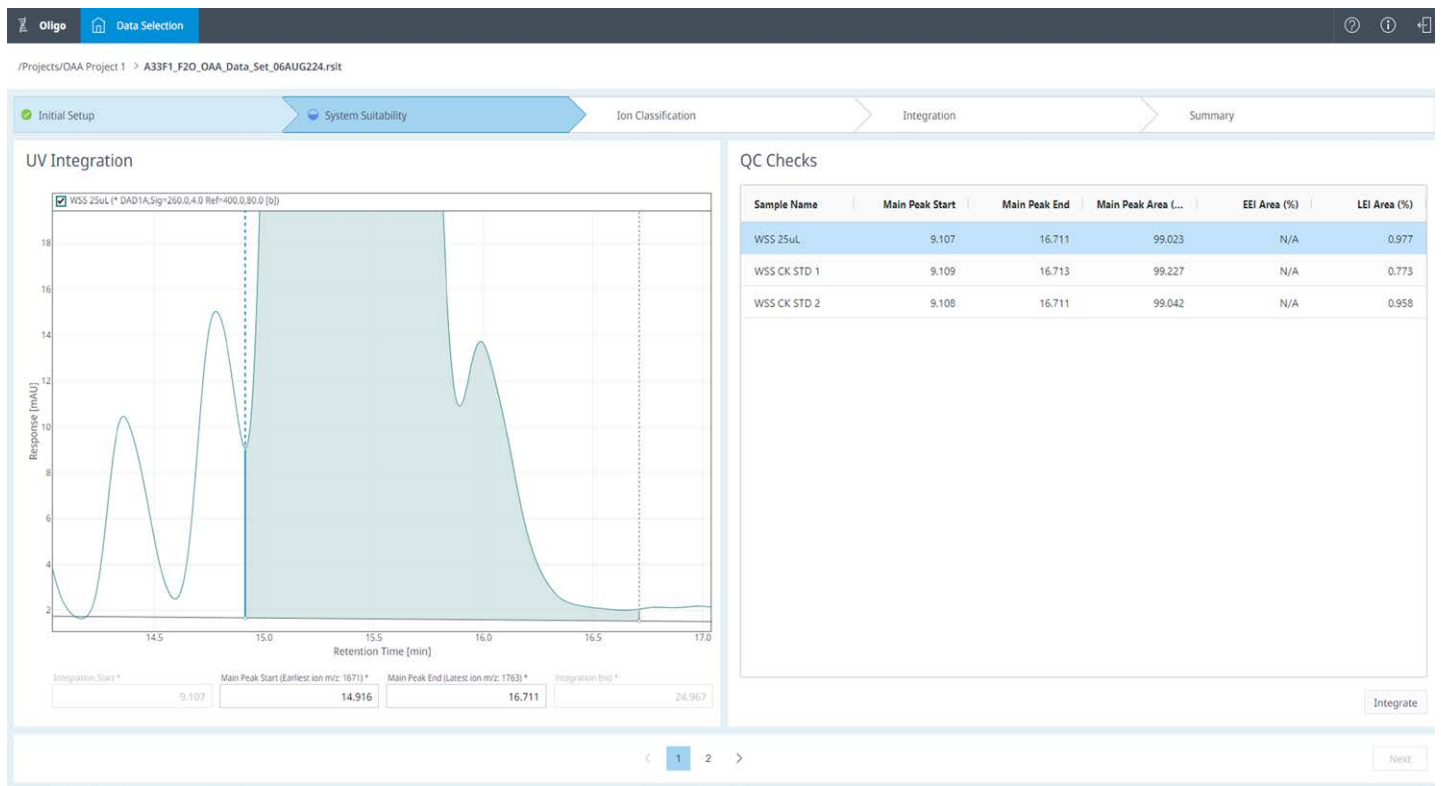


图 5. 软件将使用最早和最晚洗脱杂质的提取离子色谱图 (EICs) 自动确定 UV 主峰积分范围。用户也可以直接在软件用户界面中通过简单的单击和拖动对 UV 信号进行手动积分

离子分类

在对 UV 主峰中与 FLP 共洗脱且超过阈值的杂质峰面积进行定量分析之前，必须对 m/z 值进行分类。也就是说，任何超过谱图阈值的离子都会被识别并与离子列表匹配。然后，所有匹配成功的离子都将用于提取 EIC，以确定 EIC 峰面积，从而进行纯度计算。必须对所分析的每个样品单独进行离子分类。

工作流程的第一步仅显示经过积分的总离子流色谱图 (TIC)，以及提取的相应的平均质谱图。用户可以叠加样品的标准电离条件谱图和严苛电离条件谱图，这一功能可确保在采集和处理方法中每次进样的标签正确无误。

下一步是离子分类本身。OAA 算法已经对每个离子进行了分类，识别出任何超过特定阈值的 m/z 值。对于小于 FLP-4 电荷态的 m/z 值，阈值为 $\leq 0.2\%$ 相对丰度。对于大于 FLP-4 电荷态离子的 m/z 值，阈值为 $\leq 0.3\%$ 相对丰度。各离子的定义见表 3。

离子分类通常是一个手动过程。这是因为 CDS 平台通常不具备自动评估超过阈值的谱图 m/z 值的功能，需要由用户手动识别超过两个不同阈值的 m/z 值。然后，将任何超过阈值的 m/z 值与离子列表进行匹配，并相应地提取每个离子的 EIC 信号。为了实现每种已知杂质/可能的加合物和未知杂质的分类，必须对标准和严苛质谱条件下的样品谱图进行叠加，这使得目视检查超过阈值的离子变得越来越困难。

相比之下，OAA 会自动对这些物质进行分类，并报告理论与实测值的对比结果。此外，可以在用户界面中根据需要进行进一步检查，并且用户可以选择其他分类，而不采用软件算法确定的分类结果（图 6）。在将所有离子归类为已知或未知后，将对每个 m/z 值执行 EIC 分析。

积分

积分步骤会对每幅提取 EIC 进行评估，确保准确定量。当得到的峰面积超过 0.2% 相对定量阈值时，这些数据将用于确定 UV 主峰的纯度，进而确定样品的总体纯度。尽管由于样品复杂和色谱分离度不足等问题，手动积分通常不是常规检测应用的最佳选择，但生成的 EICs 也可能非常复杂。采用 $m/z \pm 0.5$ 窗口进行单位质量检测可能导致峰积分困难。

为了优化该工作流程，用户界面中会生成三种谱图的叠加图：FLP、标准 EIC 和严苛 EIC，如图 7 所示。FLP EIC 可作为有用的参考，指导对共洗脱峰面积进行正确积分。这对于任何近同量异位的已知杂质/可能的加合离子尤为重要。此时会将标准 EIC 与严苛 EIC 进行比较。FLP 下的峰面积判定为与加合离子有关，因此对于标准 EIC，仅对相关峰面积进行积分。

表 3. 离子分类的定义

离子	描述
分离不充分	已知杂质和未知杂质之间的质谱峰在 $m/z \pm 1.0$ 分辨率范围内
加合物	已知加合物，无重叠（即与未知杂质之间实现了 $m/z \geq 0.5$ 的分辨率）
已知杂质/可能加合物	加合物与杂质之间分离不充分的已知加合物（即加合物与已知杂质之间的分辨率为 $m/z \leq 0.5$ ）；需要叠加标准条件和严苛条件下的谱图进行确认
未知杂质	超过阈值但与离子列表中的任何值都不匹配的离子；需要叠加标准条件和严苛条件下的谱图进行确认
未检出	已知离子低于阈值

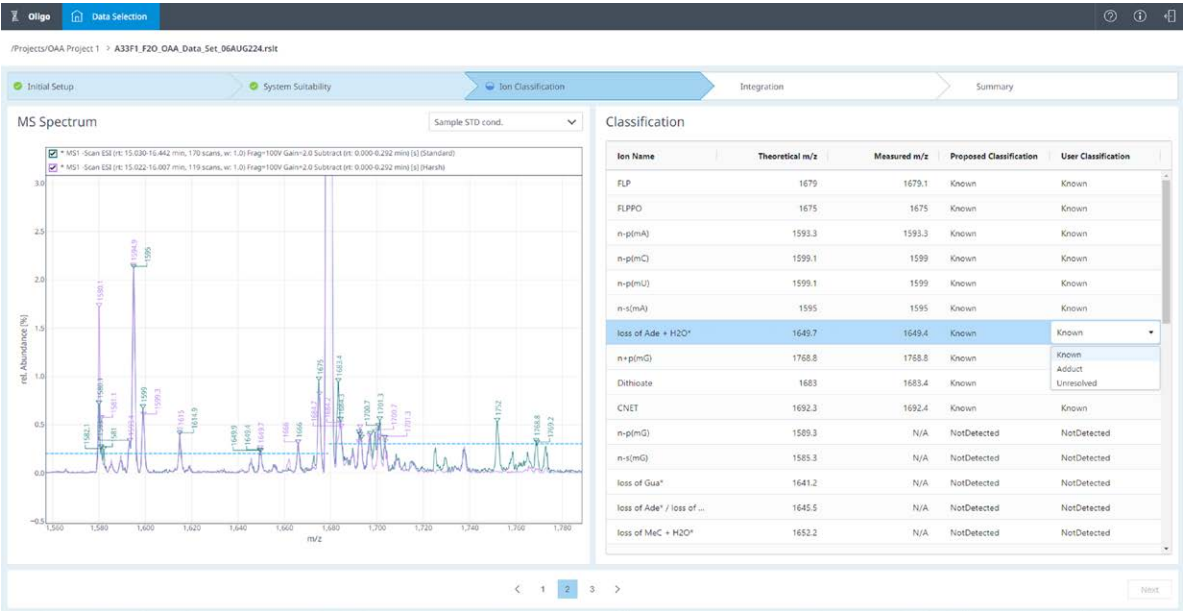


图 6. 在离子分类工作流程中，用户可以查看软件建议的分类。提供不同 MS 条件下的叠加谱图，以便确认加合物。用户还可以根据需要调整分类，任何更改都会记录在日志文件中，以确保可追溯性和数据可靠性

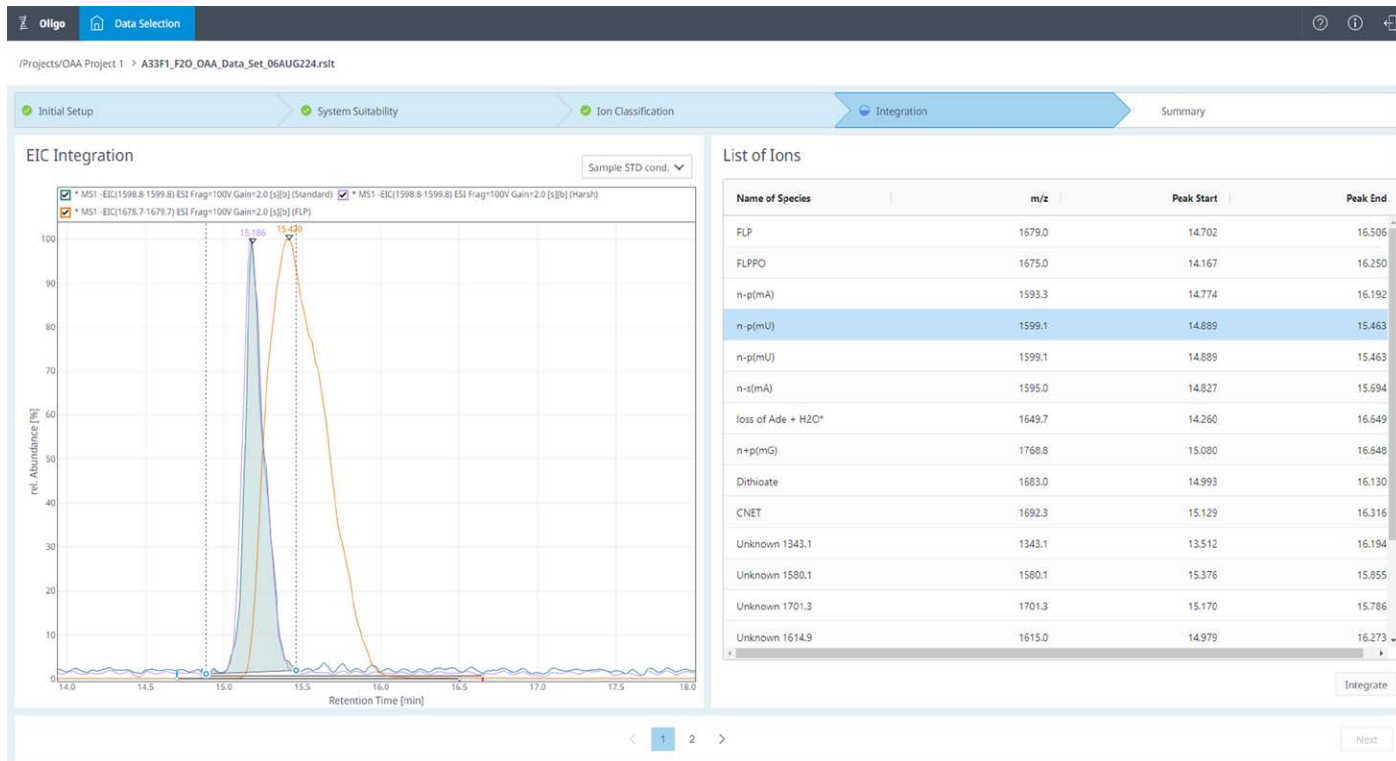


图 7. 用户界面中会自动生成长产物和标准/严苛条件下的 EICs 叠加图，以帮助实现准确积分。由于只需对标准 EIC 进行积分，用户可以选择和/或取消选择 FLP 和严苛条件下的 EIC 信号

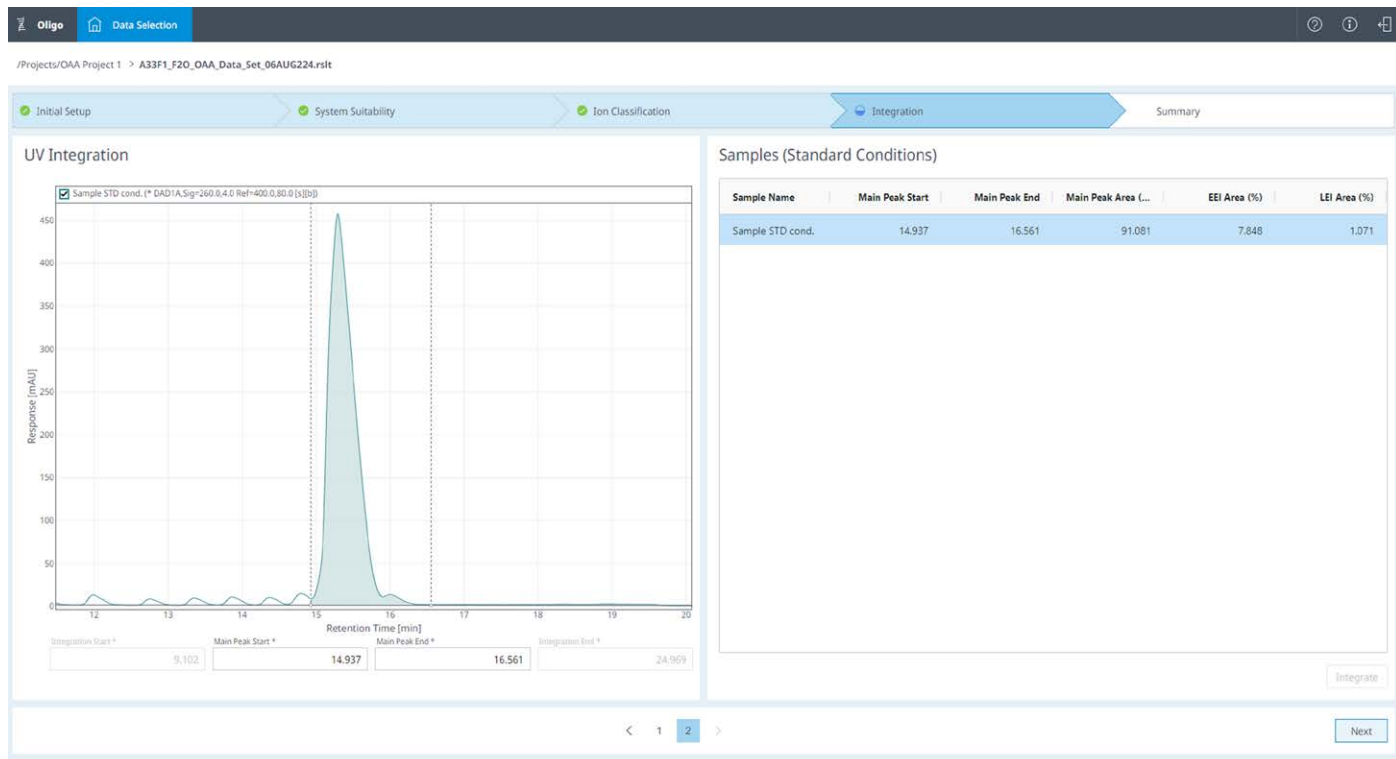


图 8. 样品 UV 积分基于早洗脱和晚洗脱杂质，与系统适用性步骤类似。如果需要，用户还可以调整积分起点和终点

所有样品的 EIC 峰积分完成后，OAA 将应用 EEI 和 LEI 设置进行 UV 主峰积分，类似于 SST 主峰积分。也即，将 EEI 峰积分起点作为主峰积分的起点，将 LEI 峰积分终点作为主峰积分的终点；UV 和 MS 信号之间的偏移会自动校正。图 8 表明，主峰积分将根据 EEI 和 LEI 积分自动进行。另外，用户仍然可以根据需要对 UV 主峰进行手动积分。

总结

工作流程的最后一步是审查结果，包括前面步骤中的 SST 结果以及纯度和鉴定结果。含量结果可能因样品所选用的配方不同而有所差异。

需要注意的是，汇总结果并不是报告，仍要使用 OpenLab CDS 报告模板来报告待审查的结果。此外，任何电子签名和批准均在 OpenLab CDS 中进行，而不是 OAA 中。同样，这是因为 OAA 利用的是 OpenLab CDS 平台中已经存在的数据合规性引擎。

未来展望

目前，LC/MS 数据分析工作流程仅限用于解析质谱或色谱图的数据系统。然而，随着寡核苷酸等复杂治疗药物的不断研发，行业对更友好、更具针对性的数据分析工具的需求日益凸显。

用于 OpenLab CDS 的安捷伦寡核苷酸分析加速器代表了分析软件开发方式的一次重大革新。

参考文献

1. Rentel, C.; Gaus, H.; Bradley, K.; Luu, N.; Kolkey, K.; Mai, B.; Madsen, M.; Pearce, M.; Bock, B.; and Capaldi, D. Assay, purity, and impurity profile of phosphorothioate oligonucleotide therapeutics by ion pair-HPLC-MS. *Nucleic Acid Ther.* **2022**, 32(3), 206–220. <https://doi.org/10.1089/nat.2021.0056>

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

如需了解有关 OpenLab CDS 寡核苷酸分析加速器的更多信息，请访问：

www.agilent.com/biopharma/oligo-analysis-accelerator

DE-001083

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，2024
2024 年 9 月 13 日，中国出版
5994-7798ZHCN