

使用搭载ACQUITY™ Premier的BioAccord™系统和全新的自动化INTACT Mass应用程序对siRNA、单向导RNA和杂质进行LC-MS分析

Catalin E. Doneanu, Patrick Boyce, Henry Shion, Joseph Fredette, Scott J. Berger, Heidi Gastall, Ying Qing Yu

Waters Corporation

摘要

本应用纪要介绍了一种自动化、合规的液相色谱-质谱(LC-MS)工作流程，可用于对包括小分子干扰RNA (siRNA)和大分子单向导(sg) RNA寡核苷酸及其杂质在内的合成寡核苷酸进行完整质量数确认和纯度分析。本文所列数据揭示了超长链寡核苷酸分析从色谱分离到纯度评估的过程中具有挑战性的方面。全新的INTACT Mass应用程序搭载于合规的waters_connect™信息学平台内，使科学家能够分析短链和长链寡核苷酸，并利用自动数据处理功能简化核酸分析。

优势

- 搭载ACQUITY Premier的BioAccord系统搭配Premier CSH™色谱柱非常适合用于短链20 mer siRNA和长链100 mer sgRNA寡核苷酸的详细表征
 - 经证明，waters_connect INTACT Mass应用程序内嵌的自动化、合规工作流程可以在使用离子对反相(IP-RP) LC-MS分析对100 mer单向导RNA (sgRNA)寡核苷酸及其杂质进行的完整质量数确认中，提供优于20 ppm的质量精度
 - 本文所述工作流程可提供所有样品组分的纯度信息，丰度水平可低至1%
-

简介

过去十年来，寡核苷酸类药物用作小分子及蛋白质药物的替代品引发了越来越多的关注^{1,2}。寡核苷酸类药物的生产和质量控制需要使用高选择性、高灵敏度的LC-MS方法。尽管固相寡聚填料取得了重大进展³，但合成寡核苷酸中仍含有多种微量(0.1–2%)杂质^{4,5}。IP-RP是用于表征寡核苷酸产物的传统LC-MS方法之一。

最近我们使用这种方法在合规的waters_connect平台下运行BioAccord LC-MS系统，开发出一个分析合成寡核苷酸的自动化工作流程^{6,8}。

图1所示即为搭载ACQUITY Premier的BioAccord系统，这是一个结构紧凑、性能稳定且简便易用的常规生物制药分析平台。这套完全集成的系统由ACQUITY Premier UPLC™系统、可变波长紫外(TUV)检测器和基于电喷雾电离飞行时间(ESI-ToF)的ACQUITY RDa质谱检测器组成。

本研究考察了该LC-MS平台对短链siRNA和长链单向导RNA寡核苷酸(sgRNA)的杂质分析能力，在工作流程中采用了全新的INTACT Mass应用程序。



图1.搭载ACQUITY Premier的BioAccord LC-MS系统

实验

试剂和样品前处理

N,N-二异丙基乙胺 (DIPEA, 纯度99.5%, 产品目录号387649-100ML) 和1,1,1,3,3,3-六氟-2-丙醇 (HFIP, 纯度99%, 产品目录号105228-100G) 购自Sigma Aldrich (美国密苏里州圣路易斯)。乙腈 (LC-MS级, 产品目录号34881-1L) 购自Honeywell (美国卡罗来纳州夏洛特)。HPLC级去离子(DI)水使用MilliQ系统 (密理博公司, 美国马萨诸塞州贝德福德) 净化。流动相现配现用。从Integrated DNA Technologies (艾奥瓦州科尔维尔) 购得10 nmol的100 mer sgRNA寡核苷酸编码HPRT1酶 (次黄嘌呤磷酸核糖基转移酶1)。寡核苷酸序列5' -G*A*U*GAU CUC UCA ACU UUA ACG UUU UAG AGC UAG AAA UAG CAA GUU AAA AUA AGG CUA GUC CGU UAU CAA CUU GAA AAA GUG GCA CCG AGU CGG UGC U*U*U* U-3' 的元素组成为C959 H1183 N376 O691 P99 S6, 平均分子量为32,292.5513 Da。RNA寡核苷酸的前三个5'核苷酸(G*A*U*)以及最后三个3'核苷酸(U*U*U*)上含有2'-OMe修饰 (星号表示这六个核苷酸均被硫代磷酸化)。

用去离子水配制浓度为5 μ M的sgRNA寡核苷酸储备液, 进样10 μ L到RP色谱柱中, 相当于柱上进样50 pmol的100 mer寡核苷酸。

使用完全集成的waters_connect INTACT Mass应用程序采集和处理所有数据集。该应用程序会自动检测UV和总离子流色谱图(TIC)数据的二维峰, 合并各LC峰的谱图, 并利用全新的自动化MaxEnt1或BayesSpray去卷积算法对质谱图进行去卷积。然后在去卷积质谱图中自动搜索产物相关物质和产物相关杂质。最后, 该应用程序会使用TUV色谱峰面积、TIC峰面积或质谱图计数计算纯度。

液相色谱条件

LC-MS系统:	搭载ACQUITY Premier产品的BioAccord系统
色谱柱:	ACQUITY Premier CSH色谱柱, 1.7 μ m, 130 Å, 2.1 \times 100 mm (部件号: 186009461)
柱温:	50 °C
流速:	300 μ L/min
流动相:	溶剂A: 40 mM HFIP (六氟异丙醇), 8 mM

DIPEA (N,N-二异丙基乙胺)，溶于去离子水中，
pH 8.8

溶剂B: 4 mM HFIP (六氟异丙醇)，4 mM
DIPEA，溶于75%乙腈中

梯度表:

时间 (min)	流速 (mL/min)	溶剂A 含量(%)	溶剂B 含量(%)	曲线图
0.00	0.3	88	12	初始
25.00	0.3	83	17	-
30.00	0.3	83	17	6
30.50	0.3	15	85	6
32.50	0.3	15	85	6
33.00	0.3	88	12	6
40.00	0.3	88	12	6

样品温度: 6 °C

样品瓶: LC-MS认证的最大回收样品瓶 (部件号
: 186005663CV)

进样体积: 10 µL

清洗溶剂:

清除溶剂: 50%甲醇

样品管理器清洗溶剂: 50%甲醇

密封清洗液: 20%乙腈的去离子水溶液

质谱条件

采集模式：	全扫描
电离模式：	ESI(-)
毛细管电压：	0.8 kV
锥孔电压：	45 V
离子源温度：	120 °C
脱溶剂气温度：	500 °C
脱溶剂气体(N ₂)压力：	6.5 bar
TOF质量范围：	400-5000
采集速率：	2 Hz
实时校正标准液：	waters_connect实时校正标准液（部件号：186009298）
数据采集软件：	waters_connect
数据处理软件：	waters_connect

结果与讨论

最近有一份应用纪要指出，IP-RP分离通常可提供足够的色谱分离度，以分离短链合成寡核苷酸(20~25 mer)的大多数主要杂质⁸。对于这类短链寡核苷酸，BioAccord就能解析所有寡核苷酸电荷态的同位素分布。本研究在搭载ACQUITY Premier的BioAccord系统上分析了在以前的应用纪要⁸中研究过的样品：经过大量修饰的21 mer寡核苷

酸及其杂质。使用搭载INTACT Mass应用程序的waters_connect信息学平台采集并自动处理数据。

21 mer合成寡核苷酸所含的修饰有：19个核苷上的2'-OMe、4个胞苷上的5-甲基、4个尿苷上的5-甲基；仅3'端剩余两个未修饰的核苷酸（胸苷）。该寡核苷酸的序列为GUA ACC AAG AGU AUU CCA UTT，通过计算得到元素组成为C229 H306 N76 O143 P20。

主要物质全长寡核苷酸的色谱和质谱数据如图2和图3所示。图2的色谱数据与之前的应用纪要一样⁸，显示了单个杂质的分离度，可以实现基于UV的定量。对累加谱图采用自动峰鉴定方法生成主峰及其失败序列杂质的去卷积谱图。图3的图A和B分别为主峰的去卷积谱图与原始谱图。模拟谱图（图3C）是算法在生成去卷积结果时使用的原始数据，可用作去卷积过程的简单质量检查。

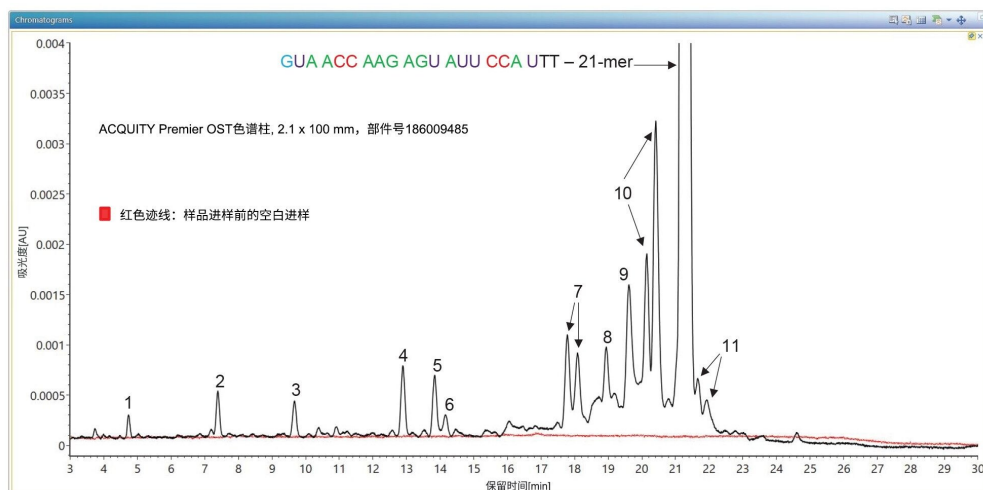
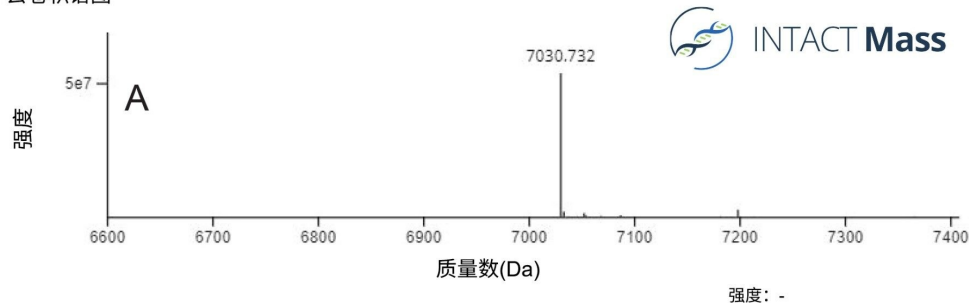
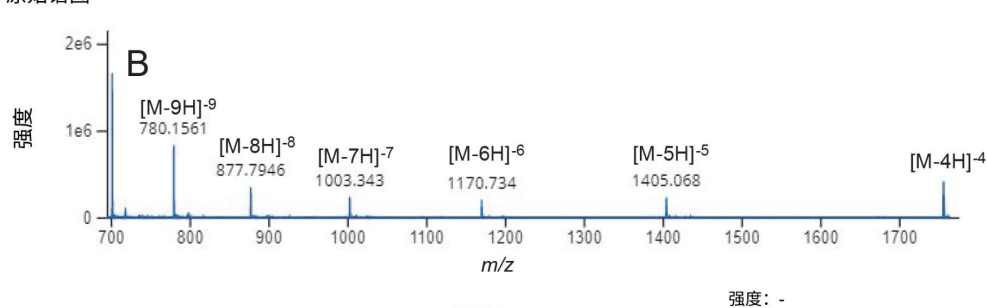


图2.在260 nm处记录的TUV色谱图，显示了从经过大量修饰的21 mer寡核苷酸中分离出的11种杂质。

去卷积谱图



原始谱图



模拟谱图

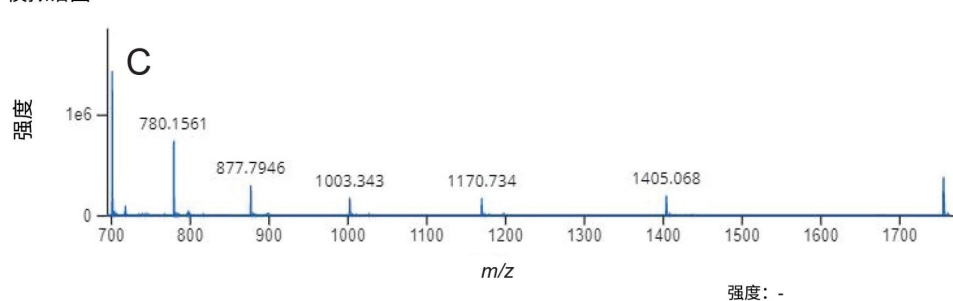


图3.21 *mer* siRNA寡核苷酸的INTACT Mass谱图：(A) *MaxEnt1*电荷去卷积谱图；(B)原始ESI-MS谱图；(C)模拟谱图，用作去卷积过程的质量检查。

分析结果汇总见图4。建议通过BayesSpray电荷去卷积算法（使用单同位素质量数）处理同位素分离的寡核苷酸，并使用该算法的自动设置鉴定与5'端核苷酸损失的失败序列相关的八种杂质（11、12、14、15、16、17、18和19 mer杂质，图2中标记1-7的峰）。此外还鉴定了与21 mer寡核苷酸相关的其他四种带有不同类型修饰的杂质（标记8-11的峰）。结果显示，该样品中存在的三种杂质（图2中标记7、10、11的三对峰）均包含两种位置异构体⁸。这一结果值得注意，表明ACQUITY Premier OST色谱柱能够对错配的寡核苷酸序列（峰7和峰10对应的双峰

) 和全长产物的脱氨基异构体 (峰11) 进行色谱分离。实验测得所有去卷积寡核苷酸质量数的质量精度均优于15 ppm。INTACT Mass应用程序根据紫外响应检测到这些微量寡核苷酸杂质的含量低至0.2%。



Component	峰编号:	Observed mass (Da)	Expected mass (Da)	Mass error (ppm)	Identity result	Observed TIC RT (mins)	Observed UV RT (mins)	LC area	LC amount (%)
D1423 n-OMeA[5] & n-OMe5MeC[2] & n-OMeG[2] & n-OMe5MeU	1	3,593.702	3,593.707	-1.5	Pass	4.74	4.69	1,222	0.2
D1423 n-OMeA[4] & n-OMe5MeC[2] & n-OMeG[2] & n-OMe5MeU	2	3,936.762	3,936.775	-3.4	Pass	7.37	7.34	2,737	0.5
D1423 n-OMeA[3] & n-OMe5MeC[2] & n-OMeG & n-OMe5MeU	3	4,638.916	4,638.907	1.9	Pass	9.66	9.61	2,625	0.5
D1423 n-OMeA[2] & n-OMe5MeC[2] & n-OMeG & n-OMe5MeU	4	4,981.988	4,981.975	2.7	Pass	12.88	12.83	5,276	0.9
D1423 n-OMeA[2] & n-OMe5MeC & n-OMeG & n-OMe5MeU	5	5,315.046	5,315.048	-0.3	Pass	13.80	13.77	4,704	0.8
D1423 n-OMeA & n-OMeG & n-OMe5MeU	6	5,991.181	5,991.188	-1.2	Pass	17.76	17.72	7,942	1.4
D1423 n-OMeA	7	6,684.310	6,684.308	0.3	Pass	19.59	19.55	13,473	2.4
D1423 n-OMe5MeU	9	6,693.332	6,693.320	1.9	Pass	20.13	20.08	13,283	2.3
D1423 n-OMe5MeC	10	6,694.315	6,694.304	1.8	Pass	20.39	20.34	26,001	4.5
D1423 unknown[-NH5]	8	7,008.354	7,008.334	2.9	Pass	20.13	20.08	13,283	2.3
D1423	主峰	7,027.390	7,027.376	2	Pass	21.22	21.19	469,430	82.0
D1423 Deamination	11	7,028.315	7,028.360	-6.5	Pass	20.39	20.34	26,001	4.5

图4. INTACT Mass软件生成的21 mer寡核苷酸及其杂质分析的处理结果截图。使用BayesSpray电荷去卷积算法对数据集进行去卷积处理，鉴定出11种寡核苷酸杂质，质量精度优于15 ppm。表中显示的第一种杂质是11 mer寡核苷酸，根据UV测量检测到的最低丰度为0.2%。

100 mer sgRNA的分析

对于中等尺寸到较大尺寸的寡核苷酸(50-100 mer)，由于IP-RP色谱分离无法完全分离所有主要杂质，且寡核苷酸ESI-MS谱图的同位素分布有重叠，使得这些分析物更难以使用LC-MS分析。例如作用于Cas9基因编辑过程的向导RNA (gRNA)。

向导RNA是在CRISPR应用中将Cas9核酸内切酶“引导”到精确的基因组位置进行基因编辑的RNA分子。在自然界中，Cas9切割双链DNA需要两个单独的RNA分子：一个高度可变的17-20 nt crRNA负责基因组靶向；一个更长(80-100 nt)、高度保守的示踪RNA (tracrRNA)用作Cas9的结合支架。在CRISPR相关应用中，这两个RNA分子可以融合在一起，形成一个正常长度为100个核苷酸的单向导RNA (sgRNA)。sgRNA通常是通过固相合成

³产生的，一般采用LC-MS分析评估纯度。合成这种长链寡核苷酸极为困难，因为在每个偶联步骤都要求非常高的产量。例如，即使每个合成步骤中偶联步骤的效率达到99.9%，对于100 mer寡核苷酸，全长产物(FLP)的预期产量也只有60%左右⁵。显然，随着FLP长度增加，寡核苷酸杂质的数量随之增加，给纯化sgRNA带来极大挑战。最近有份报告⁹考察了几种色谱柱，目的是使sgRNA及其杂质获得理想的分离结果。

本研究提出的工作流程可以快速、自动化表征sgRNA及其杂质。研究使用相同的色谱柱尺寸（内径2.1 mm x 柱长100 mm）和粒径(1.7 μm)，以三种不同的Premier C₁₈填料进行100 mer sgRNA寡核苷酸及其杂质的分离，以找到分离这些分析物的理想色谱条件。由于寡核苷酸混合物含有几种结构密切相关的组分（见表1），因此我们优化了几个色谱参数（包括梯度时间/曲线、流速、柱温），以尽可能避免色谱峰完全（完整）共流出。图5显示了在两根Premier OST色谱柱（使用130和300 Å孔的C₁₈颗粒）和一根Premier CSH（带电表面杂化）色谱柱（使用130 Å孔）上记录的三张TUV色谱图。如图所示，当使用相同的实验条件时，Premier CSH色谱柱（部件号：[186009461 <https://www.waters.com/nextgen/global/shop/columns/186009461-acquity-premier-csh-c18-column-17--m-21-x-100-mm-1-pk.html>](https://www.waters.com/nextgen/global/shop/columns/186009461-acquity-premier-csh-c18-column-17--m-21-x-100-mm-1-pk.html)）对sgRNA杂质表现出更高的色谱选择性。这一观察结果对于在母体100 mer寡核苷酸之前洗脱的杂质很明显，这种杂质只在CSH色谱柱上得到分离。仔细检查MS采集到的数据后，这种杂质与其主要对应物实现了更大程度的分离。图6显示了两种寡核苷酸在相同电荷态([M-29H]⁻²⁹)下记录的叠加提取质谱图。大部分100 mer杂质没有与丰度最高的寡核苷酸共流出。这个结果相当令人惊讶，因为该杂质与主要成分仅相差约16 Da。该杂质是通过PS转PO（脱硫）产生的。有文献指出，寡核苷酸的氧化脱硫可能发生在寡核苷酸合成过程¹⁰、寡核苷酸溶解/配制过程¹¹或者可能与源内电离伪影有关¹²。我们可以使用色谱分离区分这三种可能性，因为源内产生的伪影信号会与母体寡核苷酸完全共流出。图5中的色谱图清楚表明，寡核苷酸杂质要么来自样品（原本就存在着一定量），要么是在固体sgRNA寡核苷酸溶解于去离子水之后的溶液中产生的。为了更深入地了解这种杂质的来源，需要进一步的寡核苷酸降解研究，但本文中并没有进行此类研究。此外，结果清楚地表明，BioAccord ESI-MS源不会产生此类伪影。

寡核苷酸峰标记	寡核苷酸链的长度	寡核苷酸修饰类型, Δ质量数(Da)	元素组成	准确平均分子量	质量精度 (ppm)
杂质 1	100-mer	-16 Da (PS转PO, 脱硫)	C959 H1183 N376 O692 P99 S5	32275.4857	-0.7
母体寡核苷酸-2	100-mer	不存在修饰	C959 H1183 N376 O691 P99 S6	32291.5513	-2.1
杂质 3	100-mer	+53 Da (添加CNET、氰乙基、C ₂ H ₃ N)	C962 H1186 N377 O691 P99 S6	32344.6139	-2.7
杂质 4	100-mer	+70 Da (添加IBT、异丁酰基、C ₄ H ₈ O)	C963 H1189 N376 O692 P99 S6	32361.6411	16.3
杂质 5	100-mer	+80 Da (添加额外的磷酸盐, HPO ₃)	C959 H1184 N376 O694 P100 S6	32371.5312	-11.0

表1.100 mer sgRNA寡核苷酸中鉴定出的寡核苷酸杂质

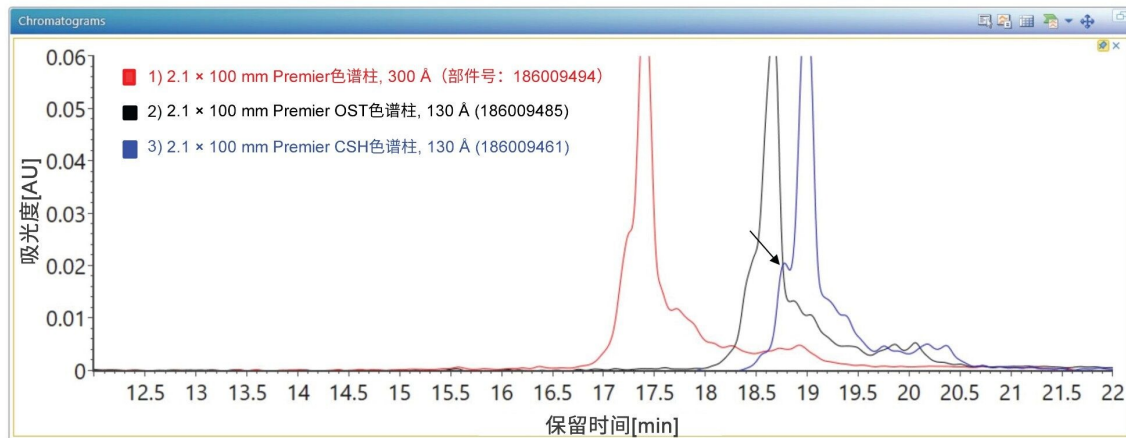


图5.在三根具有相同尺寸(2.1 x 100 mm)但填充三种不同类型 C_{18} 1.7 μm 颗粒的Premier色谱柱上分离100 mer sgRNA及其杂质的TUV色谱图，三根色谱柱分别为：孔径为130 Å的OST Premier色谱柱（黑色迹线）、孔径为300 Å的Premier PST色谱柱（红色迹线），以及孔径为130 Å的CSH（表面带电杂化）色谱柱（蓝色迹线）。与其他两根色谱柱相比，CSH色谱柱（见黑色箭头所指）明显更好地分离出一种寡核苷酸杂质，经鉴定该杂质为仅包含一个修饰（PS转PO，修饰约16 Da）的100 mer寡核苷酸。所有分离均在相同的实验条件下进行。

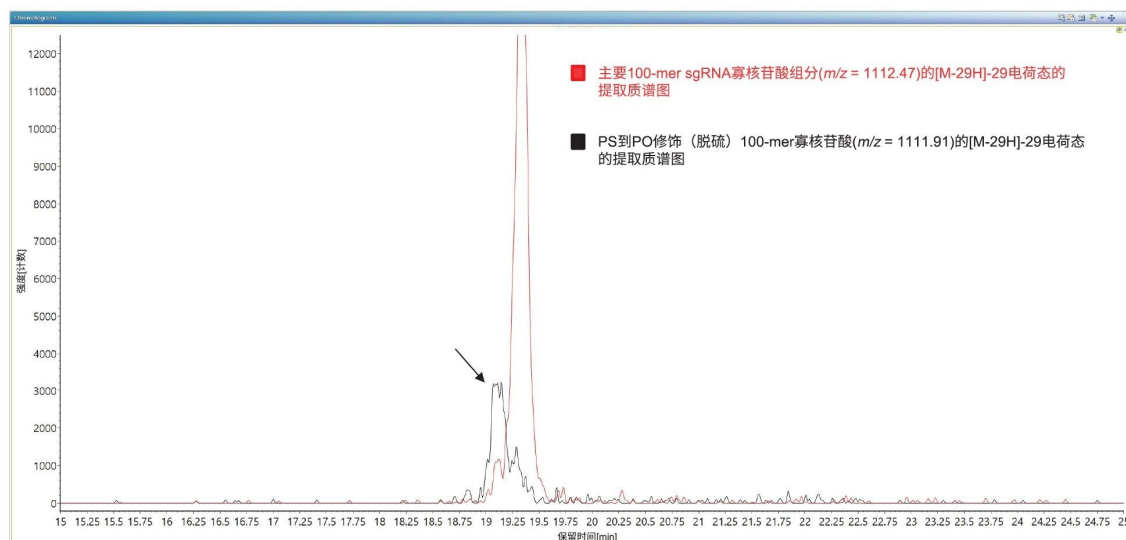


图6. 叠加提取质谱图记录了主要100 mer sgRNA寡核苷酸 ($m/z = 1112.47$, 红色迹线) 中存在的较高丰度电荷态($[M-29H]^{-29}$)以及该样品中存在的最高丰度杂质, 即PS到PO修饰的100 mer ($m/z = 1111.91$, 黑色迹线)。两张质谱图均使用0.1 Da的偏差提取。

图7更详细地展示了CSH色谱柱上记录的TUV色谱图。该色谱图清楚地表明, 要使所有密切相关的sgRNA 100 mer杂质实现基线分离非常具有挑战性。此外, 在主峰的UV信号下极有可能隐藏着几种共流出杂质。这两项观察结果表明有必要使用所有寡核苷酸杂质的ESI-MS谱图来计算寡核苷酸纯度, 而不只是使用TUV色谱图中相应的峰面积。虽然短链合成寡核苷酸(20~25 mer)及其杂质的UV和MS通道的灵敏度非常相似⁸, 但sgRNA的ESI-MS信号与UV灵敏度却不匹配。因此, 与短链寡核苷酸相比, sgRNA要达到相似的检测限(纯度水平约0.2%)非常具有挑战性(参见图2和参考资料8)。在图6的UV迹线中, 可以区分100 mer母体寡核苷酸周围的四种寡核苷酸杂质(标记为峰1、3、4和5)。

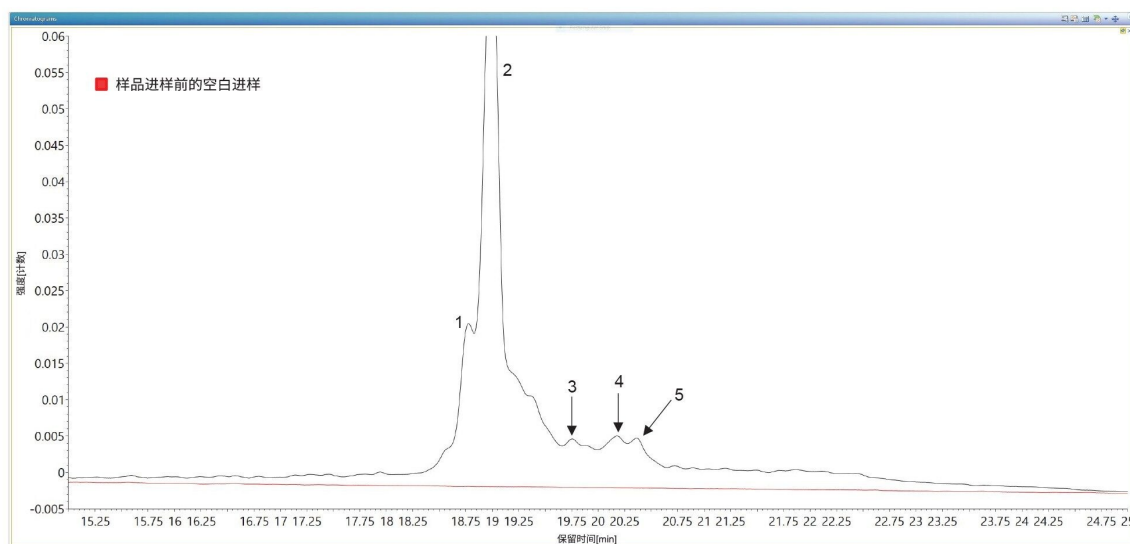
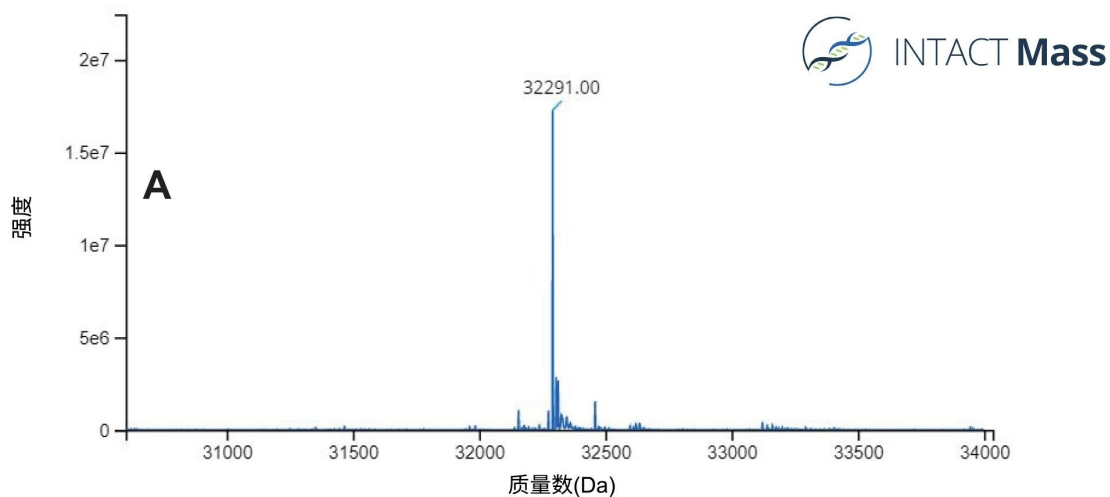


图7.100 *mer* sgRNA寡核苷酸中寡核苷酸杂质分离结果的TUV色谱图。在2.1 x 100 Premier CSH色谱柱上使用实验部分所述的25分钟梯度分析样品。红色迹线对应样品进样前的空白进样。

图8B为100 *mer* sgRNA母体寡核苷酸的ESI-MS谱图，上图（图8A）为去卷积谱图。这种寡核苷酸在三根Premier色谱柱上均获得一致的谱图与同样宽泛的电荷态分布(17-40)，且所有寡核苷酸杂质也观察到宽泛的电荷态分布（数据未显示）。优化ESI源参数（ESI电压、锥孔电压、离子源温度、脱溶剂气温度）以提高ESI-MS信号的灵敏度并减少钠加合物的信号水平。在ESI-MS谱图中降低背景的理想柱温为50 °C，证实了之前的观察结果¹³。另外值得一提的是，离子对试剂的选择、所有其他试剂的用量和化学纯度以及流动相制备程序对于生成更清晰、加合物信号水平更低的ESI-MS谱图十分重要，这些因素有助于检测低丰度的寡核苷酸杂质。仔细观察图9中脱硫杂质和主要sgRNA的两个较高丰度电荷态（33和34），可以明显看出这些密切相关的物质的ESI-MS信号得到了很好的色谱分离，如图6的提取质谱图。图8中的谱图是对图6中的两个相应色谱峰取每个峰中相对“纯”区域的ESI-MS谱图组合而产生的。这些ESI-MS谱图可以确认另外一点，即使用CSH色谱柱至少可以在一定程度上分离母体寡核苷酸与脱硫杂质。



5'-G*A*U* GAU CUC UCA ACU UUA ACG UUU UAG AGC UAG AAA UAG CAA GUU AAA AUA
 原始谱图 AGG CUA GUC CGU UAU CAA CUU GAA AAA GUG GCA CCG AGU CGG UGC U*U*U* U-3'

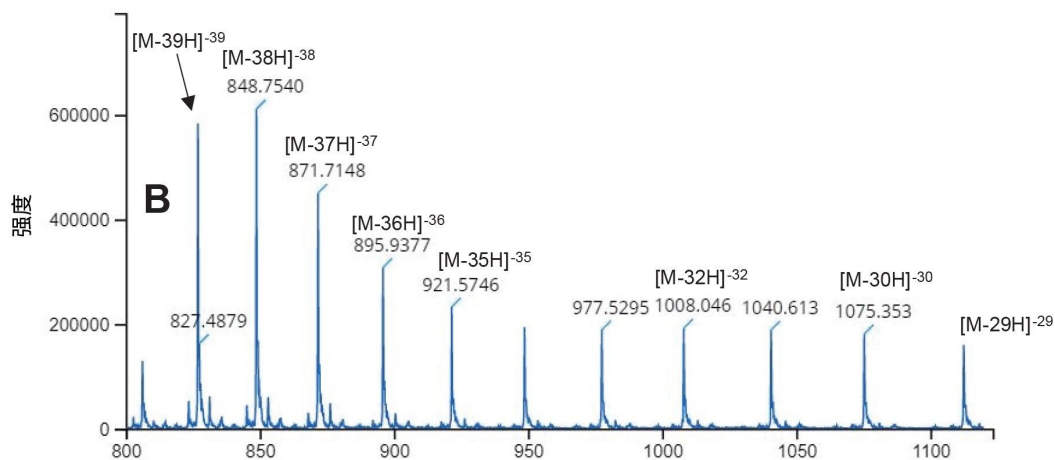


图8.丰度最高的100 *mer* sgRNA寡核苷酸的INTACT Mass谱图：(A) *MaxEnt1*电荷去卷积谱图；(B)原始ESI-MS谱图。

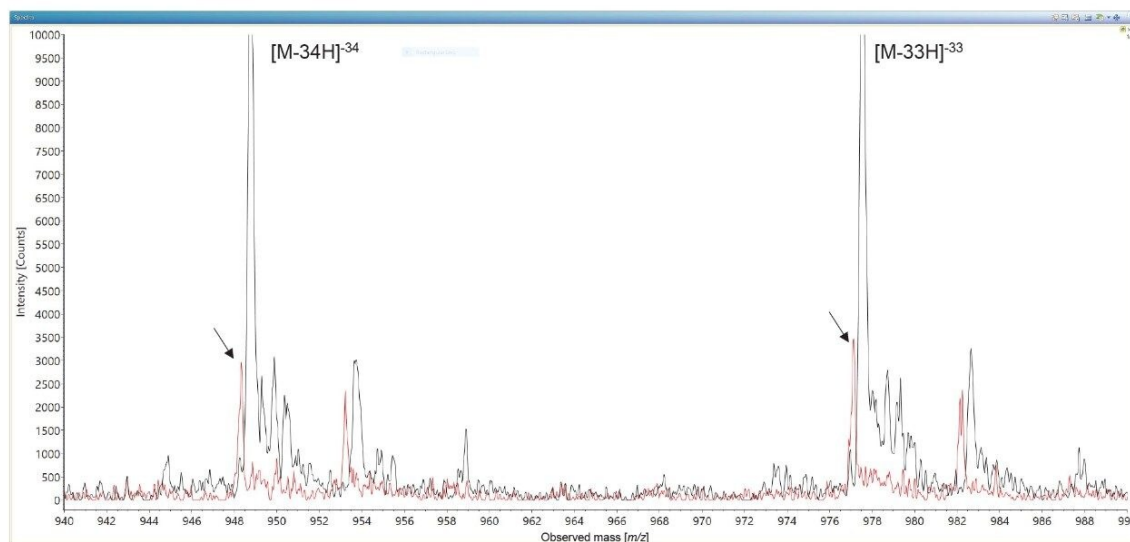


图9.100 *mer* sgRNA母体寡核苷酸（黑色迹线）及其脱硫类似物（红色迹线）的叠加ESI-MS谱图的详细视图，显示了两个较高丰度的电荷态： $[M-33H]^{-33}$ 和 $[M-34H]^{-34}$ 。两个箭头所指为PS转PO的寡核苷酸杂质产生的电荷态。如谱图所示，这两个密切相关的分子物质可以通过色谱分离。

如图7中的色谱图所示，要以足够的色谱分离度完全分离大分子寡核苷酸（例如sgRNA）中存在的所有杂质是不可行的^{4,5,13-15}，故应使用另一种定量方法取代基于UV峰面积定量寡核苷酸杂质的传统方法。在这种情况下，可以使用ESI-MS离子计数代替UV峰面积来计算寡核苷酸纯度^{14,16}。无论检测到的寡核苷酸杂质保留时间或色谱图如何，INTACT Mass应用程序¹⁷都会对所有杂质（超出用户指定阈值）执行自动去卷积。这种方法（不基于RT的自动去卷积）特别适用于分析母体寡核苷酸物质周围分布的共流出寡核苷酸杂质。在图7所示的色谱图中，所有在15~25分钟之间流出的寡核苷酸杂质的ESI-MS谱图均使用MaxEnt1算法进行了自动去卷积处理¹⁸，并使用软件优化去卷积设置。下一步将在包含各种常见和不常见寡核苷酸修饰的综合及定制谱库中自动搜索这些去卷积谱图。目前有197种可用的寡核苷酸修饰。自定义（用户定义）寡核苷酸修饰也可以轻松添加到此列表中。为分析100 *mer* sgRNA寡核苷酸选择的寡核苷酸修饰的屏幕截图如图10所示。图11为自动生成的去卷积谱图结果报告。在该结果报告中，四种寡核苷酸杂质的质量精度优于20 ppm，而MS计算出检测到的最低杂质丰度（包含额外的磷酸盐部分）约为1%。所有推定杂质的详细描述见表1。该样品中检出的杂质在之前的文献中已有描述，包括-16 Da PS至PO脱硫寡核苷酸^{10,13}、+53 Da CNET（氰乙基）修饰^{14,15}、+70 Da IBT（异丁酰基）修饰¹⁹和+80 Da额外磷酸化寡核苷酸²⁰。

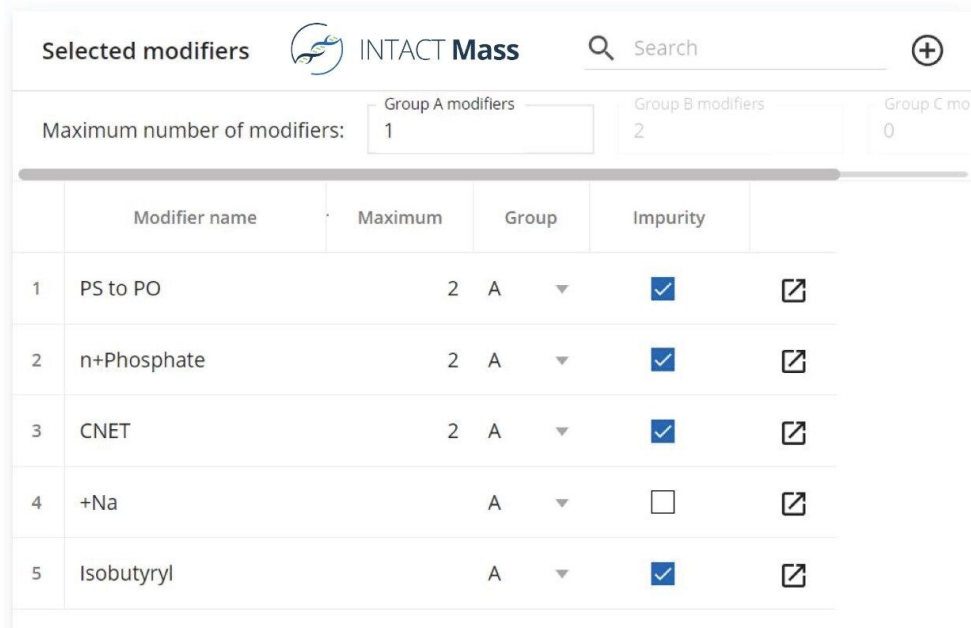


图10.为分析100 mer sgRNA寡核苷酸选择的寡核苷酸修饰的INTACT Mass屏幕截图。

The screenshot shows the INTACT Mass report. The table below summarizes the analysis results:

Type	Molecule ID	Component	Observed mass (Da)	Expected mass (Da)	Mass error (ppm)	Identity result	Observed TIC RT (mins)	Observed UV RT (mins)	LC area	LC amount (%)	MS response	MS amount (%)
Summary						Pass				73.8		
Product	32,291.5513	32291.5513 All Forms		峰编号:		Pass				73.8	55,435,131	42.5
Impurity	32,291.5513	32291.5513 PS to PO	32,275.46	1 32,275.49	-0.9	Pass	16.50		493,486	26.2	11,251,127	28.8
Product	32,291.5513	32,291.5513	32,291.47	2 32,291.55	-2.4	Pass	16.71		1,391,591	73.8	45,964,392	39.1
Product	32,291.5513	32291.5513 +Na	32,312.99	加合物 32,313.53	-16.9	Pass	16.71		1,391,591	73.8	9,470,739	8.0
Impurity	32,291.5513	32291.5513 PS to PO,CNET	32,328.38	3 32,328.55	-5.2	Pass	16.71		1,391,591	73.8	8,068,217	6.9
Impurity	32,291.5513	32291.5513 PS to PO,Isobutyryl	32,345.57	3 32,345.58	-0.2	Pass	16.71		1,391,591	73.8	7,341,735	6.2
Impurity	32,291.5513	32291.5513 Isobutyryl	32,361.10	4 32,361.64	-16.8	Pass	16.71		1,391,591	73.8	4,972,482	4.2
Impurity	32,291.5513	32291.5513 n+Phosphate	32,372.20	5 32,371.53	20.8	Warning	16.71		1,391,591	73.8	1,348,086	1.1

图11. INTACT Mass报告中显示了100 mer sgRNA寡核苷酸分析的处理结果。四种密切相关的杂质均为100 mer寡核苷酸，且质量精度优于20 ppm。根据ESI-MS响应计算杂质丰度，检出的最低丰度杂质是额外的磷酸化100 mer寡核苷酸(1%)。

结论

- 合规的waters_connect INTACT Mass应用程序能在整个色谱空间内对寡核苷酸谱图进行自动去卷积，提供快速的FLP（全长产物）完整质量数确认和杂质分配以及支持杂质分析所需的指标（质量精度和丰度）。
- waters_connect INTACT Mass应用程序可以在使用IP-RP LC-MS分析对短链siRNA和长链sgRNA寡核苷酸进行的完整质量数确认中提供优于20 ppm的质量精度。
- 本文所述工作流程可提供样品组分的纯度信息，丰度水平可低至大约1%。
- 搭载ACQUITY Premier的BioAccord系统搭配Premier CSH色谱柱非常适合用于对基因沉默应用的寡核苷酸类药物和基因编辑应用的单向导寡核苷酸(sgRNA)进行详细的完整质量数确认和纯度分析。

参考资料

1. Sharma VK, Watts JK, Oligonucleotide Therapeutics: Chemistry, Delivery, and Clinical Progress, *Future Med Chem*, 2015, 7(16), 2221–2242.
2. Roberts TK, Langer R, Wood MJA, Advances in Oligonucleotide Drug Delivery, *Nat Reviews*, 2020, 19, 673–694.
3. Obika S, Sekine M – Editors of Synthesis of Therapeutic Oligonucleotides, 1st edition, Springer, 2018.
4. Sutton JM, Guimaraes GJ, Annavarapu V, van Dongen WD, Bartlett MG, Current State of Oligonucleotide Characterization Using Liquid Chromatography-Mass Spectrometry: Insight Into Critical Issues, *J ASMS*, 2020, 31, 1775–1782.
5. Pourshahian S, Therapeutic Oligonucleotides, Impurities, Degradants, and Their Characterization by Mass Spectrometry, *Mass Spectrometry Reviews*, 2019, 00, 1–35.
6. Doneanu.等人, 利用符合法规要求的自动化LC-MS工作流程对寡核苷酸进行完整质量数确认和纯度分析, 2020, 沃特世应用纪要, [720006820ZH](#).
7. Doneanu.等人, 使用BioAccord LC-MS系统对各种经过大量修饰的寡核苷酸进行完整质量数确认分析, 2020, 沃特世应用纪要, [720007028ZH](#).

8. Doneanu.等人, 使用装配ACQUITY Premier产品的BioAccord LC-MS系统分析寡核苷酸杂质, 2021, 沃特世应用纪要, [720007301ZH](#).
9. Wei B, Wang J, Cadang L, Goyon A, Chen B, Yang F, Zhang K, Development of an Ion Pairing Reversed-Phase Liquid Chromatography Mass Spectrometry Method for Characterization of Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats Guide Ribonucleic Acids, *J Chrom A*, 2022, 1665, 462839, 1–8.
10. Reese CB, Yan H, An Approach to the Desulfurization of Oligonucleotide Phosphorothioates, *Tetrahedron Lett*, 2003, 44, 2501–2509.
11. Krotz AH, Mehta R, Hardeee GE, Peroxide-Mediated Desulfurization of Phosphorothioate Oligonucleotides and Its Prevention, *J Pharm Sci*, 2005, 94, 341–348.
12. Wu L, White DE, Ye C, Vogt FG, Therfloth GI, Matsushashi H, Desulfurization of Phosphorothioate Oligonucleotides via the Sulfur-By-Oxygen Replacement Induced by the Hydroxyl Radical During Negative Electrospray Ionization Mass Spectrometry, *J Mass Spectrom*, 2012, 47, 836–844.
13. Nikcevic I, Wyrzykiewicz TK, Limbach PA, Detecting Low-Level Synthesis Impurities in Modified Phosphorothioate Oligonucleotides Using Liquid Chromatography-High Resolution Mass Spectrometry, *Int.J Mass Spectrom*, 2011, 304, 98–104.
14. Fountain K, Gilar M, Gebler JC, Analysis of Native and Chemically Modified Oligonucleotides by Tandem Ion-Pair Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography/Electrospray Ionization Mass Spectrometry, *Rapid Commun.Mass Spectrom*, 2003, 17, 646–653.
15. Capaldi D, Teasdale A, Henry S, Akhtar N, den Besten C, Gao-Sheridan S, Kretschmer M, Sharpe N, Andrews B, Burm B, Foy J, Impurities in Oligonucleotide Drug Substances and Drug Products, Impurities, Degradants, and Their Characterization by Mass Spectrometry, *Nucleic Acid Ther*, 2017, 27, 309–322.
16. Rousis SG, Cedillo I, Rentel C, Automated Determination of Early Eluting Impurities Using Ion-Pair Reversed-Phase Liquid Chromatography High Resolution-Mass Spectrometry, *Anal Biochem*, 2020, 595, 113623.
17. Henry Shion.等人, Intact Mass - 用于生物治疗药物快速质量数确认和纯度评估的多功能waters_connect应用程序.沃特世应用纪要, [720007547ZH](#), 2022.

18. Ferrige AG, Seddon MJ, Green BN, Jarvis SA, Skilling J, Disentangling Electrospray Spectra With Maximum Entropy, *Rapid Commun.Mass Spectrom.*, 1992, 6, 707–711.
19. Rodriguez AA, Cedillo I, McPherson AK, Formation of the N2-acetyl-2,6-diaminopurine Oligonucleotide Impurity Caused by Acetyl Capping *Bioorgan Med Chem Letters*, 2014, 24, 3243–3246.
20. Smith M, Beck T, Quantitation of a Low-Level Coeluting Impurity Present in a Modified Oligonucleotide by both LC-MS and NMR, *J Pharm Biomed Anal*, 2016, 118, 34–40.

特色产品

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

生物制药领域专用的BioAccord LC-MS系统 <<https://www.waters.com/waters/nav.htm?cid=135005818>>

waters_connect <<https://www.waters.com/waters/nav.htm?cid=135040165>>

720007546ZH, 2022年4月修订



© 2023 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