

使用 LabSolutions Insight™ Biologics 进行寡核苷酸杂质分析的工作流程

加藤纪子、中园纯菜

特点描述

- ◆ 使用 LabSolutions Insight Biologics 软件，可通过简单的工作流程进行寡核苷酸和杂质的特性评价。
- ◆ 可以进行寡核苷酸杂质的同时鉴定。
- ◆ 通过片段覆盖度界面，缺失位置和修饰位置一目了然。

简介

近年来，核酸药物飞速发展，作为一种新的药物发现方式受到了广泛关注。但是，为了确认作为药物的安全性和有效性，需要对杂质进行全面检测和鉴定。本文中介绍了利用四极杆飞行时间质谱仪 LCMS-9050 和 LabSolutions Insight Biologics 进行杂质分析的工作流程。

样品

测定用序列是 CTGCTAGCCTCTGGATTGA、为经硫代磷酸修饰的 20-mer 寡核苷酸粗品（以下称：粗品 PS20mer）。

分析条件

测定仪器使用 Nexera™XS inert 和 LCMS-9050，使用了 Data Dependent Acquisition(DDA) 模式。LC 条件如表 1 所示，MS 条件如表 2 所示。

表 1 LC 条件

[HPLC 条件] (NexeraXS 生物惰性系统)				
色谱柱	Shim-pack Scepter™ Claris C18-120, 50 mm × 2.1 mm I.D., 1.9 μm ⁺			
流动相	A) 含 100 mM HFIP/10 mM TEA 的水溶液 B) 含 50 mM HFIP/5 mM TEA 的 50% 甲醇			
梯度程序				
	时间 (min)	流量 (mL/min)	A 浓度	B 浓度
	0.00	0.3	95	5
	1.00	0.3	95	5
	26.00	0.3	60	40
	26.10	0.3	10	90
	30.00	0.3	10	90
	30.10	0.3	95	5
	34.00	0.3	95	5
柱温	60 °C			
进样量	2 μL			

*1: P/N 227-31210-02

表 2 MS 条件

[MS 的条件] (LCMS-9050)	
离子化	ESI (负离子模式)
模式	MS 扫描 (m/z550~2500), DDA
接口电压	-3.0 kV
雾化气流量	3.0 L/min
干燥气流量	10.0 L/min
加热气体流量	10.0 L/min
DL 温度	250 °C
加热器温度	400 °C
接口温度	350 °C

分析参数设置

LabSolutions Insight Biologics 是用于寡核苷酸及其杂质特性评价的分析软件。首先，在参数设置界面中选择事先注册的核碱基、连接子、核糖、碱基修饰等来创建序列。上述核碱基、连接子、核糖、碱基修饰可自由追加和编辑。输入序列后显示分子式和单同位素质量，右侧显示结构式（图 1）。可实时显示所输入序列的结构式，直观确认输入错误。

如图 2 所示，为了方便查看，不同核碱基部分以不同颜色显示，而且还可以显示碎片位置。

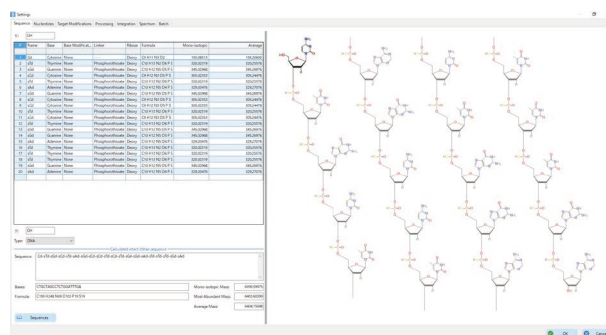


图 1 参数设置画面

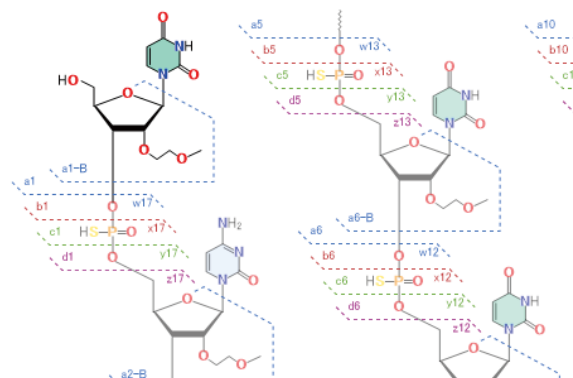


图 2 显示片段部分

在目标修饰的选项卡中选择预期的杂质。除链长差异、核碱基缺失、脱嘌呤/嘧啶、脱氨基、保护残基等的杂质、加合离子和未知修饰体之外，还可以对用户添加的分子变化进行搜索设置。

■分析结果

粗品 PS20mer 通过 PDA 和 MS 进行检测。各色谱图如图 3 所示。LC 色谱图和 MS 色谱图可以上下显示,进行峰值确认。

MS 色谱图显示为组分色谱图,该色谱图基于 MS1 质谱,并结合不同电荷数和同位素峰的质谱信号。PS20mer 的多电荷离子质谱图和解卷积质谱图如图 4 所示。

寡核苷酸杂质的质谱图也被解卷积,用于杂质的检索。

根据 MS1 数据对杂质进行了详细的搜索,共鉴定出不同链长、碱基缺失体、离子加合物等 30 余种杂质。

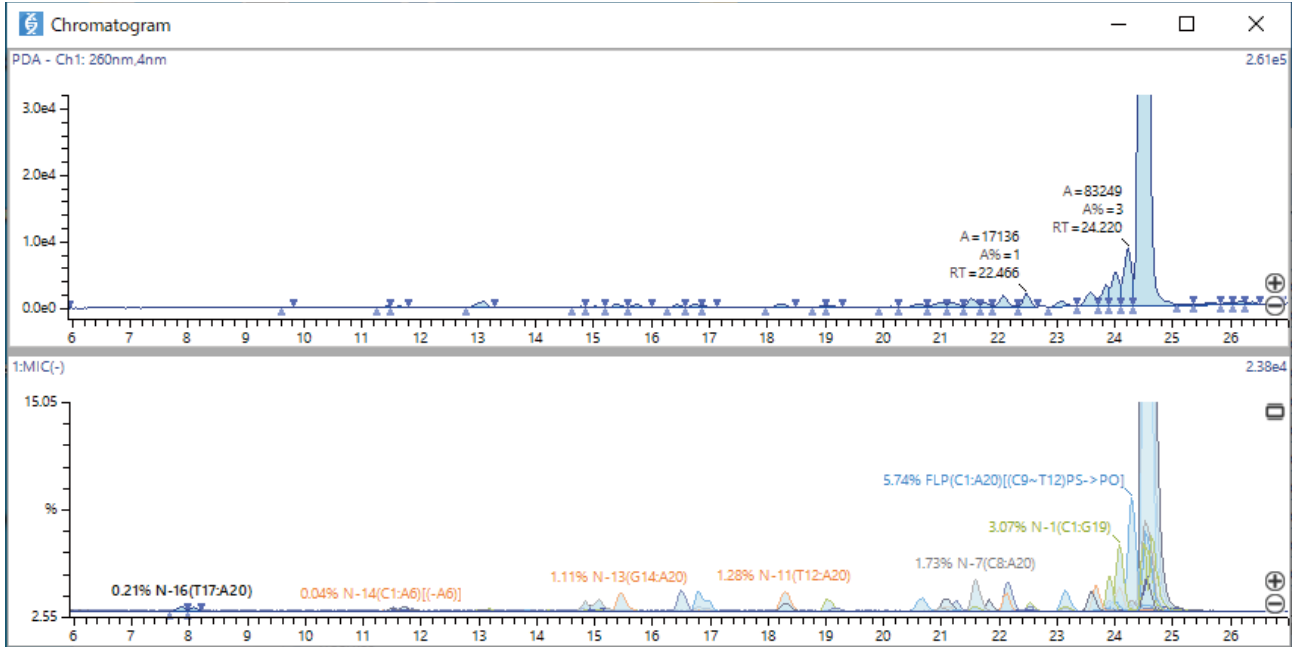


图 3 粗品 PS20mer 的 UV 色谱图 (上) 和组分色谱图 (下)

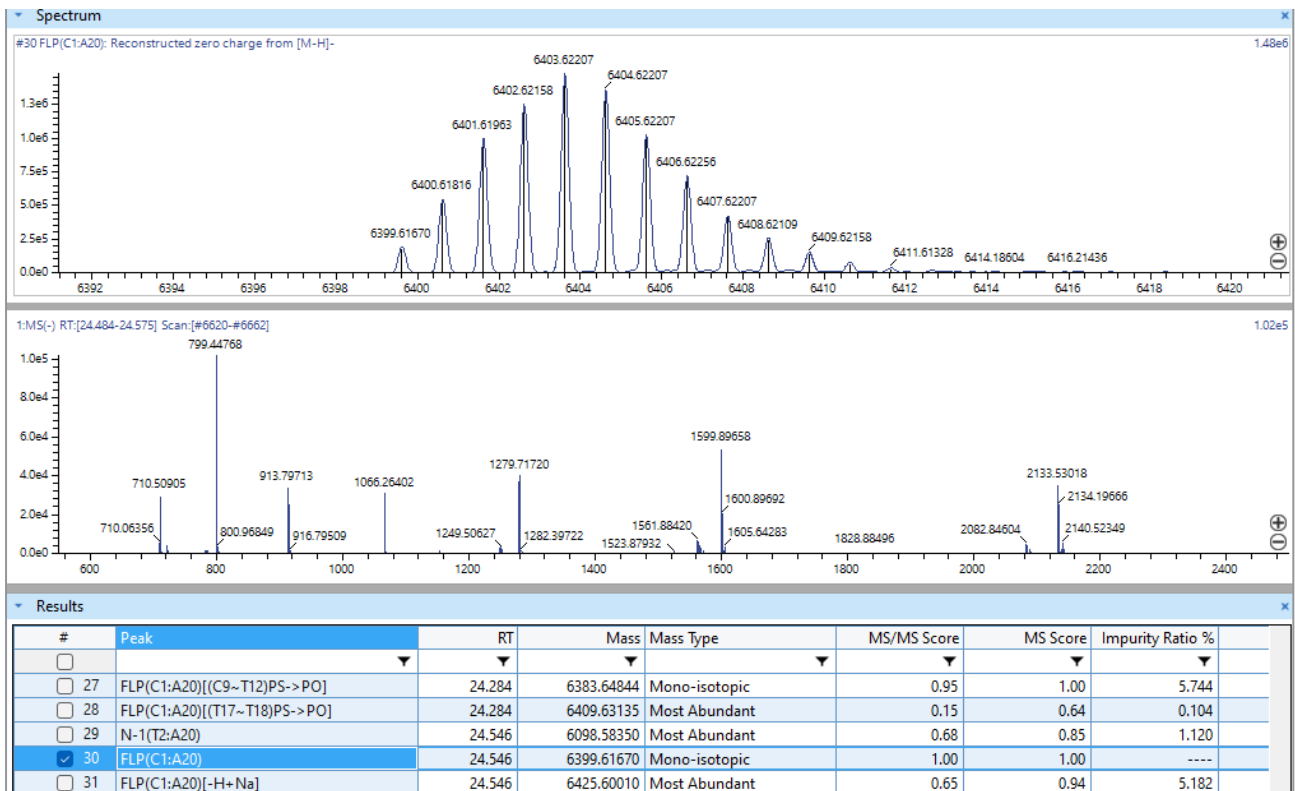


图 4 PS20mer 的质谱图 (下) 和解卷积质谱图 (上)

此外，该软件可基于 MS2 的碎片离子显示序列覆盖度。碎片离子在 PS20mer 序列中的分配结果如图 5、6 所示。每个核碱基处碎裂生成的碎片离子，与序列保持一致。

序列覆盖度显示有两种模式，填充模式可查看分配离子的强度信息和全面性，分支模式可显示碎片序列，可以根据需要确认的项目进行切换。

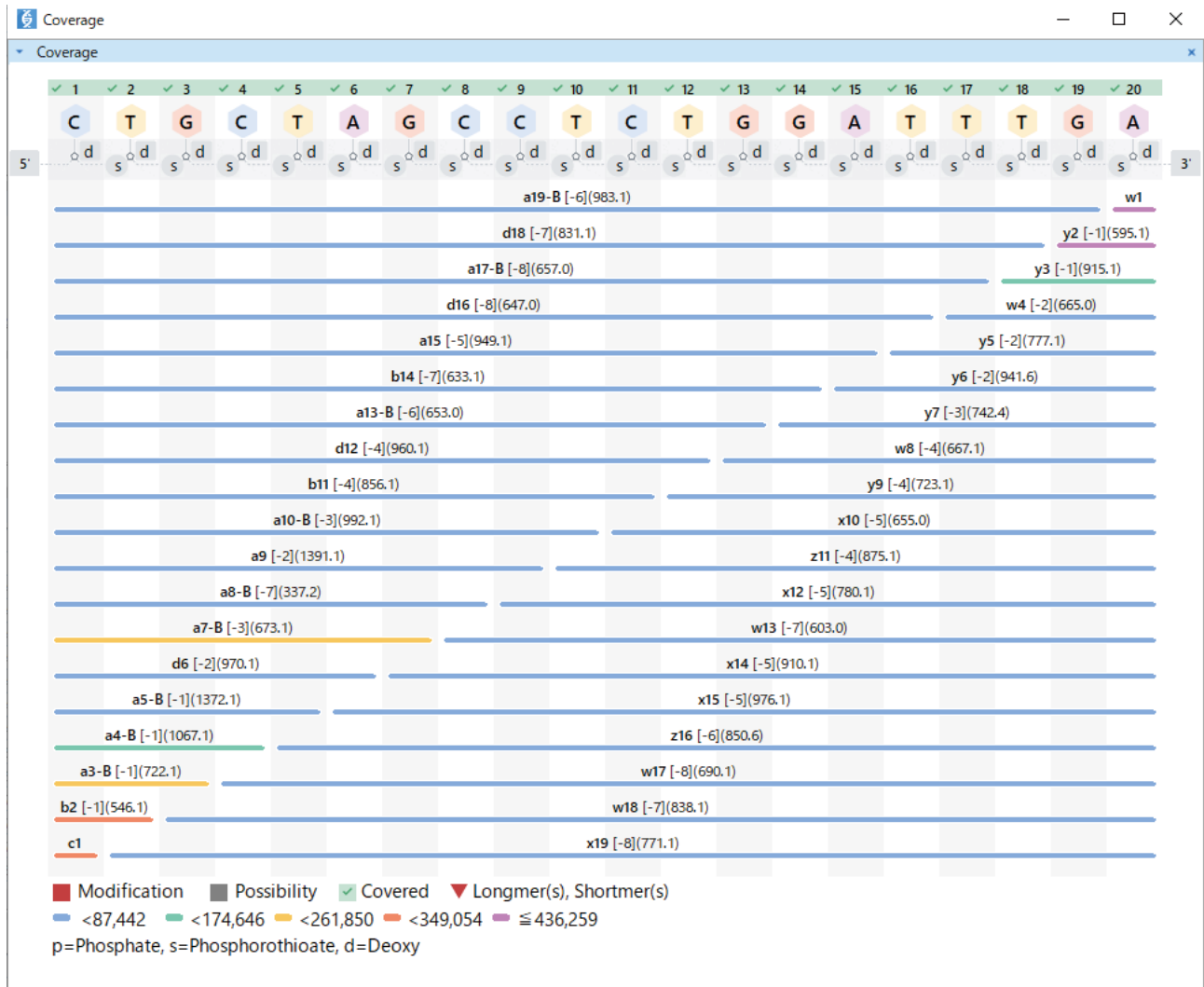


图 5 PS20mer 序列覆盖度（填充模式）

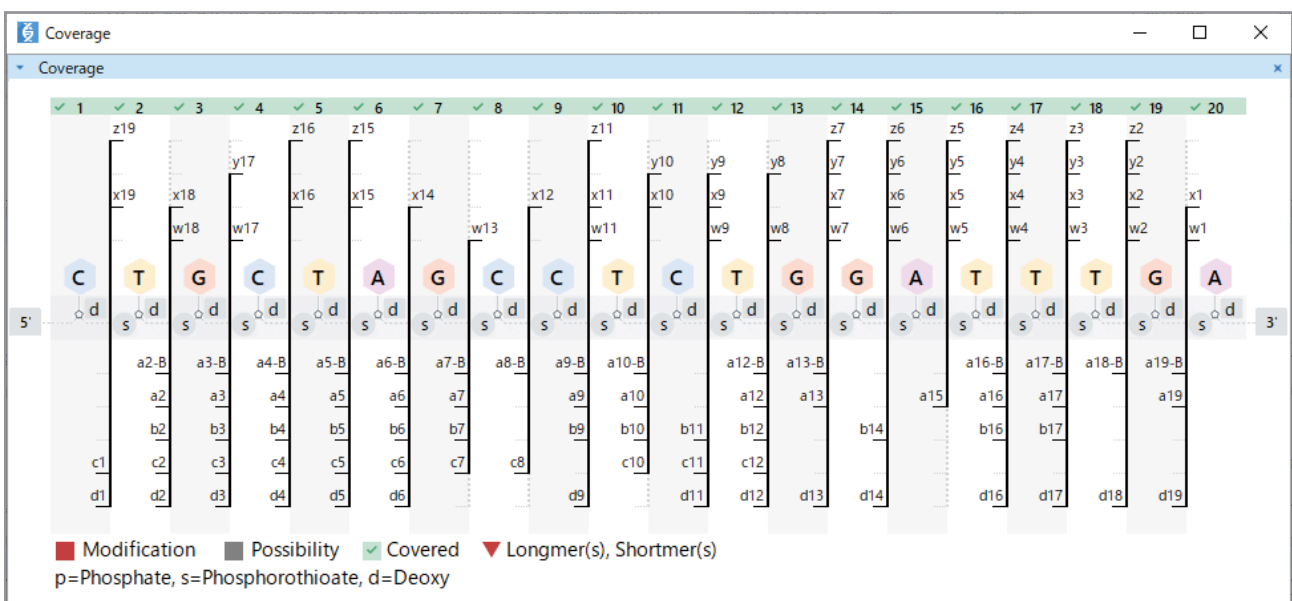


图 6 PS20mer 序列覆盖度（分支模式）

■确认杂质的序列

从 5' 端缺失 14 个核苷酸的杂质（下称 N-14）的序列，其相对于主成分的丰度比为 0.5%。如通过图 7 确认的核碱基上部的绿色√标志所示，通过高覆盖度证实了分析结果的可靠性。

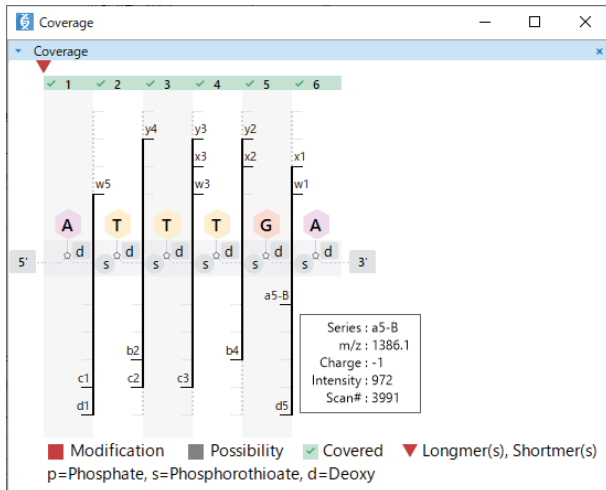
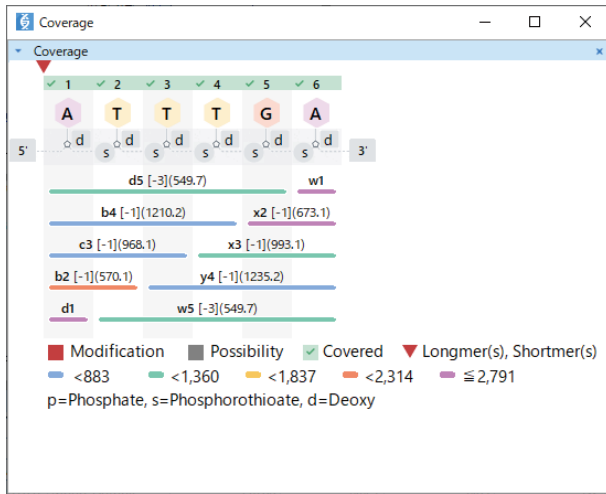


图 7 N-14 的序列覆盖率

■结论

使用 LabSolutions Insight Biologics 软件可以对寡核苷酸的杂质进行全面鉴定和序列确认。

不仅主要成分得到了完整的序列覆盖，丰度比 0.5% 的杂质也能得到很高的序列覆盖度。

<致谢>

在本文中介绍的测定样品是由 PeptiStar 株式会社提供的。对该公司的协助深表感谢。

LCMS、LabSolutions Insight、Nexera 和 Shim-pack Scepter 是岛津制作所株式会社或其相关公司在日本及其他国家 / 地区的商标。

岛津应用云



岛津企业管理（中国）有限公司
岛津（香港）有限公司

<http://www.shimadzu.com.cn>

用户服务热线电话： 800-810-0439
400-650-0439

免责声明：

* 本资料未经许可不得擅自修改、转载、销售；
* 本资料中的所有信息仅供参考，不予任何保证。
如有变动，恕不另行通知。

第一版发行日：2023 年 06 月