

应用纪要

## 使用ACQUITY QDa检测器评估寡核苷酸分析中的替代离子对试剂

---

Robert E. Birdsall, Ying Qing Yu

Waters Corporation



---

## 摘要

本应用纪要评估了替代离子对试剂在寡核苷酸分析中的适用性。

由于新上市的治疗性寡核苷酸具有新的理化性质，要实现最佳色谱条件，可能需要采用IP-RPLC/MS技术，并将替代离子对缓冲液与TEA:HFIP结合使用。Waters OST色谱柱在高pH和长时间高温的替代方法条件下表现出高度稳定性，可纳入现有ACQUITY QDa工作流程。总的来说，本研究表明，沃特世针对分析人员当下在寡核苷酸分析中面临的挑战提供了一个经济有效的解决方案，该解决方案灵活、可靠且易于部署。

## 优势

- 替代离子对试剂具有方法兼容性
- 通过减少IP-RPLC试剂用量尽可能降低成本
- 采用在线正交检测技术提高分析效率

---

## 简介

电喷雾电离(ESI)法分析寡核苷酸通常使用由三乙胺(TEA)和1,1,1,3,3,3-六氟-2-丙醇(HFIP)组成的缓冲液，部分原因在于，HFIP缓冲试剂可提高质谱(MS)灵敏度，如Apffel及其同事的研究所述<sup>1,2</sup>。众所周知，质量数信息在鉴定富有挑战性的碱基修饰方面具有优势<sup>3</sup>。然而，由于新上市的新型碱基修饰寡核苷酸具有新的理化性质，要实现最佳色谱条件，可能需要除TEA（可以用HFIP缓冲）以外的替代离子对试剂。最近有研究表明，除TEA以外，还可以将其他胺与HFIP搭配使用，通过IP-RPLC/MS技术产生足够的MS响应<sup>4</sup>。如先前使用ACQUITY QDa质谱检测器的研究所示，MS检测提供的质量数信息可提高合成治疗性寡核苷酸分析工作流程的效率<sup>5</sup>。

本研究自然延伸为使用ACQUITY QDa评估替代离子对试剂在寡核苷酸分析中的适用性，使用了一组长度为15 nt~35 nt的polyT标准品以及一个ssRNA序列(5'-UCGUCAAGCGAUUACAAGGTT-3')来评估方法重复性、色谱柱寿命和分析可比性。本研究评估了三乙胺(TEA)、丁胺(BA)和二丁胺(DBA)用作替代离子对试剂的效果。

---

## 实验

### 样品描述

三乙胺（纯度99.5%）、丁胺（纯度99.5%）、二丁胺（纯度99.5%）和1,1,1,3,3,3-六氟2-丙醇（纯度99.8%，LC-MS级）购自Sigma Aldrich。Optima系列溶剂购自Fisher Scientific。流动相缓冲液在实验开始前现配。PolyT寡核苷酸标准品购自沃特世（部件号：186004135），制得浓度为10 pmol/uL的溶液。ssRNA上链(5'-UCGUCAAGCGAUUACAAGGTT-3')购自Integrated DNA Technologies。柱上载样量保持50 pmol不变。

### 液相色谱条件

液相色谱系统：	ACQUITY UPLC H-Class
液相色谱检测器：	配备钛流通池的ACQUITY UPLC TUV，ACQUITY QDa质谱检测器
吸收波长：	260 nm
色谱柱：	ACQUITY UPLC BEH C <sub>18</sub> 寡核苷酸分析专用柱, 1.7 μm, 2.1 mm x 50 mm
柱温：	60 °C
样品温度：	10 °C
进样体积：	5 μL

### 流动相

TEA:HFIP

流动相A: 15 mM TEA, 400 mM HFIP水溶液, pH 8.0

流动相B: 15 mM TEA, 400 mM HFIP的甲醇溶液

BA:HFIP

流动相A: 15 mM BA, 50 mM HFIP水溶液, pH 9.0

流动相B: 15 mM BA, 50 mM HFIP的甲醇溶液

DBA:HFIP

流动相A: 15 mM DBA, 25 mM HFIP水溶液, pH 9.5

流动相B: 15 mM DBA, 25 mM HFIP的甲醇溶液

流动相使用重量法配制。

## 检测器条件

检测器: ACQUITY QDa

采样速率: 2点/秒

质量范围: 410-1250 Da

模式: 负离子

采集模式: 连续

锥孔电压：	20 V
毛细管电压：	0.8 kV
探头温度：	600 °C

数据管理

带有MaxEnt1的MassLynx SCN 9.25

---

## 结果与讨论

开发色谱方法的过程需要根据多种因素做出决策，包括分析稳定性、分离度和选择性。许多分析人员开发方法通常是从搜索文献开始的，目的是确定所需分离是否具有优先级，从而建立对比基准。在基于IP-RPLC/MS的寡核苷酸分析中，由TEA:HFIP组成的缓冲液因具有较高的分离效率和MS兼容性而成为对比的“黄金标准”<sup>1,2</sup>。在这一点上，我们一开始就进行了可比性测试，确定替代胺是否能产生与TEA:HFIP组成的流动相类似的色谱图以及足够的MS响应。

之前的研究表明，流动相为15 mM TEA和400 mM HFIP时，0.5% B/min的梯度足以分离一组长度为15 nt~35 nt的polyT标准品<sup>6</sup>。本实验以该分离为基准，使用丁胺和二丁胺进行了可比性研究，结果见图1。替代胺的浓度保持15 mM不变，调整HFIP的浓度以获得理想MS响应，如Gong等人之前发表的研究所述<sup>4</sup>。丁胺和二丁胺搭配的HFIP浓度分别为50 mM和25 mM。

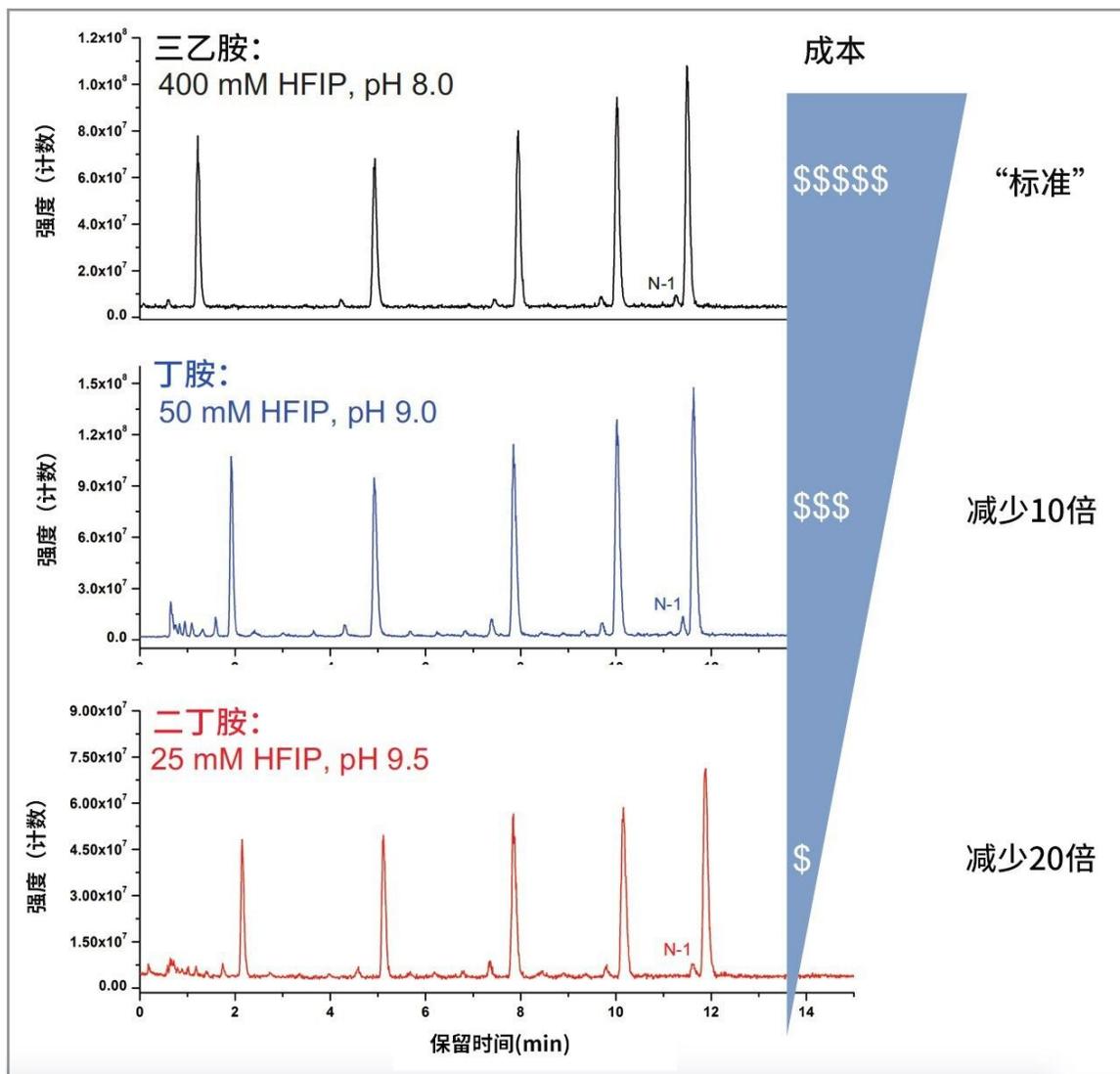


图1.评估替代离子对试剂。分别使用400 mM、50 mM和25 mM HFIP缓冲的三甲胺、丁胺和二丁胺分离MassPREP OST polyT混标的ACQUITY QDa响应。

如图1所示，两种替代胺的选择性相近。此外，丁胺在梯度为0.46% B/min时即可达到与TEA:HFIP相似的选择性，但起始有机相组成较低；而二丁胺需要将梯度加倍增至0.80% B/min，且起始有机相组成与TEA:HFIP相似。这些结果表明，HFIP的浓度和胺的疏水性会影响寡核苷酸在色谱柱上的保留。不过可以通过“调节”分离条件实现所需的分离，在本实验中是为了匹配TEA:HFIP分离的选择性。

TEA:HFIP和BA:HFIP之间的质谱检测器响应相似，BA:HFIP的信号响应略高。相比之下，尽管载样量相同，但

DBA:HFIP运行显示的信号强度下降约2倍。DBA:HFIP分离中的信号强度虽然降低，但并不妨碍检测失败序列的峰（N-1，图1），表明用HFIP缓冲的丁胺和二丁胺等替代胺可产生足够的MS信号响应以供分析。

有趣的是，我们在可比性测试中意外观察到一个与分析成本有关的推论。MS级纯度的试剂（如HFIP）成本高昂，这在开发寡核苷酸分析方法时通常会产生顾虑。图1表明，与TEA:HFIP相比，丁胺和二丁胺等离子对试剂可以在维持分析选择性的同时减少HFIP用量，从而降低分析成本，由此成为IP-RPLC/MS技术中一种有吸引力的替代品。如图1所示，降低HFIP浓度会导致流动相pH >8.0，这可能会影响色谱柱的使用寿命。

为了测试适度增加pH对色谱柱使用寿命的影响，我们选择了使用丁胺(15 mM BA:50 mM HFIP, pH 9.0)制备的流动相进行评估。该研究将梯度延长到30分钟，斜率为0.5% B/min。在整个使用寿命研究过程中，每24小时重新制备一批200 mL的流动相。为节省样品，使用该方法连续进样四个空白水溶液，然后再进样polyT混标。如图2所示，PolyT标准品在400次进样中的分离表现出高度重复性，色谱图几乎相同。计算前四个峰相对于最后一个峰的选择性，用这种方式考察色谱柱在高pH和高温下的稳定性。对根据实验数据计算的值得取每24小时时间段的平均值，并报告相应的误差棒，如图3所示。经测定，200小时内400次进样的选择性值的RSD小于1%。

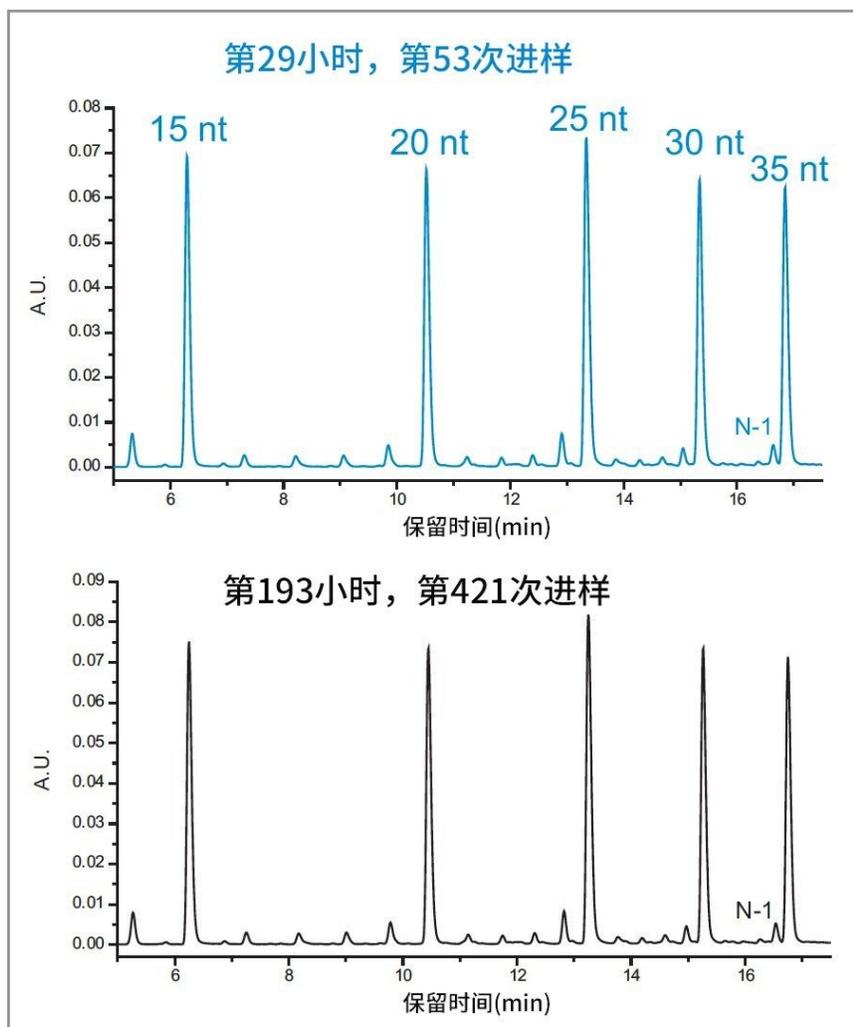


图2.评估色谱柱在高 $pH$ 下的使用寿命。使用一个30分钟的方法分离 *MassPREP OST polyT*混标, 在200小时内进样400次。从标样以及失败序列(N-X)的色谱图可以看出, *PolyT*标准品的分离表现出高度重复性。

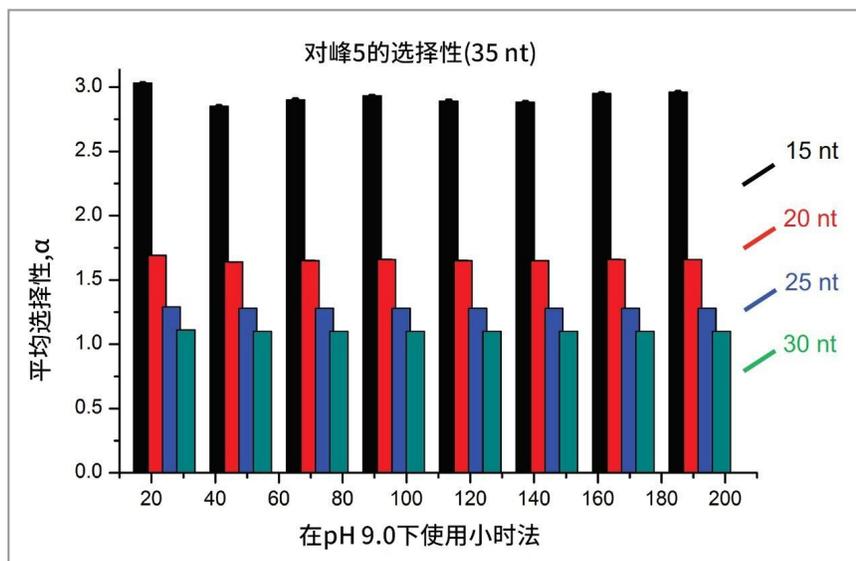


图3. 色谱柱选择性评估。计算在高pH和高温下分离的前四个标样峰(15–30 nt)相对于最后一个峰(35 nt)的选择性。对根据实验数据计算的值取每24小时时间段的平均值，并报告相应的误差棒。选择性值的RSD小于1%。

为了进一步考察色谱柱性能，我们评估了保留时间和半高峰宽的分析间差异。如表1所示，整个进样系列的保留时间非常稳定，RSD ≤ 1.66%。峰宽也非常稳定，平均半高峰宽 ≤ 0.08 min，RSD ≤ 1.49%。总的来说，以上数据证实，Waters OST色谱柱在高pH和长时间高温的方法条件下能够表现出高度稳定性。确认了使用替代离子对流动相组成时的可比性和色谱柱使用寿命后，我们使用更具代表性的寡核苷酸样品测试了所提方法的适用性。

分析间差异					
峰	平均分子量	RT (min)	RSD (%)	W <sub>50</sub>	RSD (%)
15 nt	4500.9	6.15	1.66	0.077	0.90
20nt	6021.9	10.34	0.97	0.078	0.70
25 nt	7542.9	13.16	0.72	0.079	0.68
30 nt	9063.8	15.16	0.65	0.078	1.49
35 nt	10584.8	16.65	0.59	0.078	0.83

表1. 在整个进样系列中评估了保留时间和半高峰宽(W<sub>50</sub>)的分析间差异。测得的平均保留时间的RSD ≤ 1.66%，测得的平均半高峰宽 ≤ 0.08 min，RSD ≤ 1.49%。

TEA:HFIP和BA:HFIP流动相在21 nt ssRNA分离中的对比如图4所示。两种流动相组成在高分离度梯度下均使N-1和N+1杂质与目标峰分离，结果表现出高度可比性。与前述条件相似，BA:HFIP流动相的初始%B与TEA:HFIP相比更低，二者分别为7%和13%。BA:HFIP的梯度斜率稍低于TEA:HFIP，分别为0.6% B/min和0.8% B/min，这很可能是因为丁胺的疏水性较弱，只需少量洗脱液便能从键合相表面解吸<sup>7,8</sup>。此外，ssRNA在两种流动相条件下观察到的ACQUITY QDa响应值具有高度可比性（TEA:HFIP中为 $1.68 \times 10^8$ ，BA:HFIP中为 $1.43 \times 10^8$ ）。使用BA:HFIP从更具代表性的寡核苷酸中分离杂质序列的能力进一步证实，可以使用除TEA:HFIP之外的其他离子对试剂探索寡核苷酸分析的替代IP-RPLC/MS解决方案，从而提高MS灵敏度并潜在地降低分析成本。

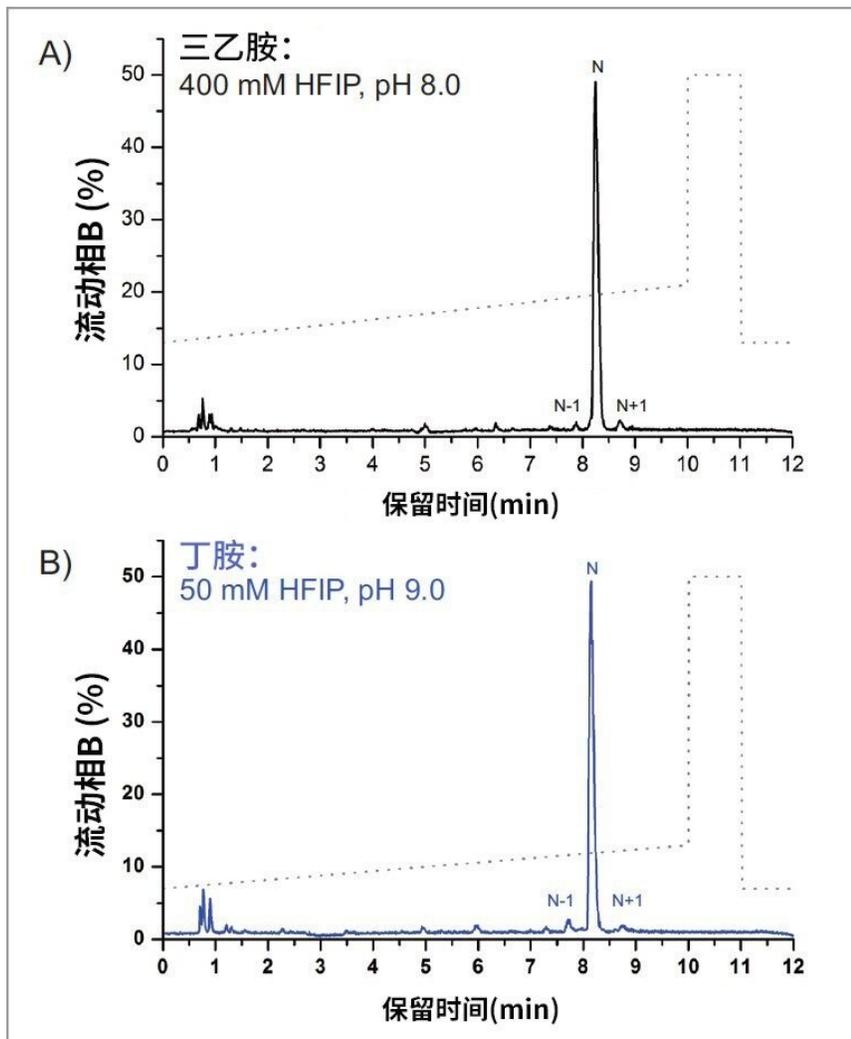


图4. ssRNA的杂质分析。使用高分离度梯度分离21 nt ssRNA (5'-UCGUCAAGCGAUUACAAGGTT-3')与N-1和N+1杂质，使用的流动相组成为A) 15 mM TEA : 400 mM HFIP和B) 15 mM BA : 50 mM HFIP。

## 结论

由于新上市的治疗性寡核苷酸具有新的理化性质，要实现最佳色谱条件，可能需要采用IP-RPLC/MS技术，并将替代离子对缓冲液与TEA:HFIP结合使用。Waters OST色谱柱在高pH和长时间高温的替代方法条件下表现出高度稳

定性，可纳入现有ACQUITY QDa工作流程。总的来说，本研究表明，沃特世针对分析人员当下在寡核苷酸分析中面临的挑战提供了一个经济有效的解决方案，该解决方案灵活、可靠且易于部署。

---

## 参考资料

1. Apffel, A.; Chakel, J.A.; Fischer, S.; Lichtenwalter, K.; Hancock, W.S. Analysis of Oligonucleotides by HPLC-Electrospray Ionization Mass Spectrometry. *Analytical Chemistry* 1997, 69 (7), 1320–5.
2. Apffel, A.; Chakel, J.A.; Fischer, S.; Lichtenwalter, K.; Hancock, W.S. New procedure for the use of highperformance liquid chromatography–electrospray ionization mass spectrometry for the analysis of nucleotides and oligonucleotides. *Journal of Chromatography A* 1997, 777 (1), 3–21.
3. McGinnis, A.C.; Chen, B.; Bartlett, M.G. Chromatographic methods for the determination of therapeutic oligonucleotides. *Journal of Chromatography B* 2012, 883–884, 76–94.
4. Gong, L.; McCullagh, J. S.O. Comparing ion-pairing reagents and sample dissolution solvents for ion-pairing reversed-phase liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometry analysis of oligonucleotides. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 2014, 28 (4), 339–350.
5. High-throughput Screening of Oligonucleotides for Identity and Purity Assessment Using the ACQUITY QDa Detector and ProMass for MassLynx. Waters Application Note. 2016. 720005681EN.
6. ACQUITY QDa质谱检测器在合成寡核苷酸分析中的应用. 沃特世应用纪要. 2016. 720005632ZH.
7. Gilar, M. Analysis and Purification of Synthetic Oligonucleotides by Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography with Photodiode Array and Mass Spectrometry Detection. *Analytical Biochemistry* 2001, 298, 196.
8. Gilar, M.; Fountain, K.J.; Budman, Y.; Neue, U.D.; Yardley, K.R.; Rainville, P.D.; Russell, R.J. II; Gebler, J.C. Ion-pair reversed-phase high-performance liquid chromatography analysis of oligonucleotides: retention prediction. *Journal of Chromatography A* 2002, 958, 167.

---

## 特色产品

[ACQUITY UPLC H-Class PLUS系统 <https://www.waters.com/10138533>](https://www.waters.com/10138533)

[ACQUITY QDa质谱检测器 <https://www.waters.com/134761404>](https://www.waters.com/134761404)

[ACQUITY UPLC可变波长紫外检测器 <https://www.waters.com/51422>](https://www.waters.com/51422)

[MassLynx MS软件 <https://www.waters.com/513662>](https://www.waters.com/513662)

720005830ZH, 2016年11月

©2019 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