

使用MaxPeak™ Premier BEH C₁₈ 300 Å寡核苷酸分析专用柱改善长链寡核苷酸分析物的分离度

摘要

离子对反相液相色谱法广泛用于寡核苷酸的鉴定、纯度和完整性表征，这对于诊断和治疗药物的开发和质量控制非常重要。多核苷酸分析物的检测灵敏度和保留性不仅取决于色谱柱固定相的表面化学性质，还取决于它的孔径。选择合适的孔径有助于长链寡核苷酸与固定相有效相互作用，并尽量减少受限扩散效应，从而实现峰容量的提升。本文报告了在ACQUITY™ Premier BEH C₁₈ 300 Å 1.7 μm寡核苷酸分析专用柱上以兼容在线质谱(MS)检测的方式对单链(ss)异源脱氧核糖核苷酸(DNA) Ladder的高效分离。

优势

- 新的参比物质作为ssDNA寡核苷酸Ladder，用于寡核苷酸的LC分析
- 使用ACQUITY Premier BEH C₁₈ 300 Å寡核苷酸分析专用柱，为长链寡核苷酸提供出色的分离度
- 长度超过70个核苷酸的寡核苷酸实现了分离度改善，与此同时，短链寡核苷酸的分离性能得以保留
- 无论使用何种离子对试剂，都能得到可靠且稳定的分离性能
- 可重现的高质量性能以及准确可靠的质量数测量

简介

先进的分析工具有助于加快新型核酸诊断和治疗药物的开发进程¹⁻⁴。反相液相色谱-质谱联用法(RPLC-MS)是在寡

核苷酸开发的各个阶段以及药代动力学研究中对寡核苷酸进行定性和定量表征的首选方法。在这类分析中，将挥发性烷基胺用作离子对(IP)试剂可改善寡核苷酸在反相色谱柱上的保留性和分离度⁵⁻⁷。IP试剂的类型决定了IP-RPLC方法的分离选择性和保留性³。此外，使用六氟异丙醇等弱酸性缓冲离子对试剂时，可以使寡核苷酸的IP-RPLC分析与质谱(MS)兼容⁸⁻¹⁰。

除固定相的表面化学性质外，还需要考虑其孔径。固定相的孔径会影响寡核苷酸分离的选择性、保留性和分离度。平均孔径将决定分析物分子能否扩散进出多孔颗粒结构，以及能否分配到颗粒间和颗粒内的空间中¹¹。与表面积相对较小的大孔径(300 Å)固定相相比，小孔径(90–130 Å)固定相的单位柱床长度可提供更大的表面积，因此，短链寡核苷酸(<50mer)的保留时间会相应地延长¹²。但是，较大的分析物在穿过较小的孔结构时会遇到空间位阻。当分析物被限制进入颗粒内表面积或因阻碍分析物从小孔中扩散而出现峰展宽时，可能会观察到这种情况。相比之下，较大的孔则更容易使长链寡核苷酸进入，从而提高分离度^{4,12}。本研究采用300 Å孔径的Premier BEH C₁₈色谱柱来分析70 mer以上（包括80 mer、90 mer和100 mer）的寡核苷酸，与小孔径色谱柱相比，该色谱柱表现出始终如一的出色分离度和高质量性能。

实验

样品信息

参比物质购自沃特世（美国马萨诸塞州米尔福德）。本实验将ssDNA 10~60 Ladder（沃特世P/N: [186009449 <https://www.waters.com/nextgen/global/shop/standards--reagents/186009449-ssdna-10-to-60-ladder.html>](https://www.waters.com/nextgen/global/shop/standards--reagents/186009449-ssdna-10-to-60-ladder.html)）和ssDNA 20~100 Ladder（沃特世P/N: [186009448 <https://www.waters.com/nextgen/global/shop/standards--reagents/186009448-ssdna-20-to-100-ladder.html>](https://www.waters.com/nextgen/global/shop/standards--reagents/186009448-ssdna-20-to-100-ladder.html)）（表1）分别重悬于100 μL Milli-Q水中。轻轻混合后，将样品瓶内容物转移至容量为300 μL的聚丙烯自动进样器样品瓶(P/N: [186002639 <https://www.waters.com/nextgen/global/shop/vials-containers--collection-plates/186002639-polypropylene-12-x-32-mm-screw-neck-vial-with-cap-and-preslit-pt.html>](https://www.waters.com/nextgen/global/shop/vials-containers--collection-plates/186002639-polypropylene-12-x-32-mm-screw-neck-vial-with-cap-and-preslit-pt.html))中，进行离子对反相液相色谱(IP-RP-LC)分离，并使用BioAccord™ RDa检测器在负离子模式下进行质谱(MS)分析。

Ladder	DNA成分	元素组成	核苷酸组成	单同位素质量数 (Da)	平均质量数 (Da)
10~60	10 mer	C ₉₈ H ₁₂₄ N ₃₇ O ₅₉ P ₉	C:2 T:3 A:2 G:3	3041.544	3043.046
	15 mer	C ₁₄₆ H ₁₈₃ N ₆₁ O ₈₈ P ₁₄	C:4 T:2 A:2 G:7	4631.799	4634.059
	20 mer	C ₁₉₅ H ₂₄₆ N ₇₅ O ₁₁₈ P ₁₉	C:5 T:5 A:5 G:5	6114.05	6117.045
	25 mer	C ₂₄₃ H ₃₀₇ N ₉₃ O ₁₄₈ P ₂₄	C:7 T:6 A:6 G:6	7638.297	7642.032
	30 mer	C ₂₉₂ H ₃₆₈ N ₁₁₃ O ₁₇₇ P ₂₉	C:8 T:7 A:8 G:7	9186.555	9191.044
	40 mer	C ₃₈₉ H ₄₈₉ N ₁₅₄ O ₂₃₄ P ₃₉	C:11 T:8 A:12 G:9	12268.073	12274.055
20~100	50 mer	C ₄₈₇ H ₆₁₂ N ₁₉₁ O ₂₉₅ P ₄₉	C:13 T:11 A:14 G:12	15371.573	15379.066
	60 mer	C ₅₈₅ H ₇₃₄ N ₂₃₁ O ₃₅₄ P ₅₉	C:15 T:13 A:17 G:15	18484.085	18493.09
	20 mer	C ₁₉₅ H ₂₄₆ N ₇₅ O ₁₁₈ P ₁₉	C:5 T:5 A:5 G:5	6114.05	6117.045
	30 mer	C ₂₉₂ H ₃₆₈ N ₁₁₃ O ₁₇₇ P ₂₉	C:8 T:7 A:8 G:7	9186.555	9191.044
	40 mer	C ₃₈₉ H ₄₈₉ N ₁₅₄ O ₂₃₄ P ₃₉	C:11 T:8 A:12 G:9	12268.073	12274.055
	50 mer	C ₄₈₇ H ₆₁₂ N ₁₉₁ O ₂₉₅ P ₄₉	C:13 T:11 A:14 G:12	15371.573	15379.066
	60 mer	C ₅₈₅ H ₇₃₄ N ₂₃₁ O ₃₅₄ P ₅₉	C:15 T:13 A:17 G:15	18484.085	18493.09
	70 mer	C ₆₈₄ H ₈₅₇ N ₂₇₀ O ₄₁₄ P ₆₉	C:16 T:16 A:20 G:18	21611.596	21622.126
	80 mer	C ₇₈₁ H ₉₇₉ N ₃₀₈ O ₄₇₄ P ₇₉	C:19 T:18 A:22 G:21	24700.097	24712.125
	90 mer	C ₈₇₈ H ₁₁₀₂ N ₃₄₃ O ₅₃₅ P ₈₉	C:22 T:21 A:24 G:23	27763.591	27777.111
100 mer	C ₉₇₆ H ₁₂₂₄ N ₃₈₃ O ₅₉₄ P ₉₉	C:24 T:23 A:27 G:26	30876.103	30891.135	

表1.ssDNA 10~60 Ladder和ssDNA 20~100 Ladder的各组分

液相色谱条件1

液相色谱系统:	ACQUITY Premier BSM系统 (BioAccord系统的一部分)
检测器:	ACQUITY UPLC TUV检测器
波长:	260 nm
色谱柱:	ACQUITY Premier BEH C ₁₈ , 300 Å, 1.7 μm, 2.1 × 150 mm寡核苷酸分析专用柱, P/N: 186010541 ACQUITY Premier BEH C ₁₈ , 130 Å, 1.7 μm, 2.1 × 150 mm寡核苷酸分析专用柱, P/N: 186009486

柱温:	70 °C
样品温度:	4 °C
进样:	5 µL
流速:	0.3 mL/min
流动相A:	含7 mM三乙胺(TEA) (作为IP试剂) 和40 mM 1,1,1,3,3,3-六氟异丙醇(HFIP)的Milli-Q水溶液, pH 8.6
流动相B:	含3.5 mM TEA和20 mM HFIP的50:50甲醇: Milli-Q水溶液

梯度表1

时间 (min)	流速 (mL/min)	%A	%B	曲线
初始	0.3	95	5	*
60.00	0.3	75	25	6
61.00	0.3	50	50	6
62.00	0.3	95	5	6
80.00	0.3	95	5	6
运行时间 = 80 min				

液相色谱条件2

液相色谱系统:	ACQUITY Premier BSM系统 (BioAccord系统的一部分)
检测器:	ACQUITY UPLC TUV检测器
波长:	260 nm
色谱柱:	ACQUITY Premier BEH C ₁₈ 寡核苷酸分析专用柱, 300 Å, 1.7µm, 2.1 X 150 mm ACQUITY Premier BEH C ₁₈ 寡核苷酸分析专用柱, 130 Å, 1.7µm, 2.1 X 150 mm
柱温:	70 °C
样品温度:	4 °C
进样:	5 µL
流速:	0.4 mL/min
流动相A:	含0.1% N,N-二异丙基乙胺(DIPEA) (作为IP试剂) 和1% 1,1,1,3,3,3-六氟异丙醇(HFIP)的Milli-Q水溶液
流动相B:	含0.0375% DIPEA和0.075% HFIP的65:35乙腈: Milli-Q水溶液

梯度表2

时间 (min)	流速 (mL/min)	%A	%B	曲线
初始	0.4	95	5	*
60.00	0.4	82	18	6
60.50	0.4	5	95	6
61.00	0.4	95	5	6
80.00	0.4	95	5	6
运行时间 = 80 min				

质谱条件

质谱系统:	BioAccord LC-MS系统
检测器:	ACQUITY RDa检测器
模式:	碎裂模式下的全扫描
极性:	负
锥孔电压:	40 V
碎裂锥孔电压:	80-200 V
质量范围:	高(400~5000 m/z)

扫描速率：	2 Hz
毛细管电压：	0.80 kV
脱溶剂气温度：	400 °C

信息学软件

利用waters_connect™平台的Intact Mass分析应用程序计算寡核苷酸的中性质量数值。

结果与讨论

使用一组ACQUITY Premier BEH C₁₈寡核苷酸分析专用柱，填充孔径为300 Å或130 Å的吸附剂，对ssDNA 10~60和20~100 Ladder进行IP-RP-LC-MS分析。在负离子模式下重复采集三次数据。使电喷雾离子源的锥孔电压在低能量(40 V)和高能量(80~200 V)之间交替，以采集完整寡核苷酸和寡核苷酸片段的质量数。

300 Å孔径的BEH C₁₈吸附剂对寡核苷酸分析物的分离度改善如图1-2所示。图1显示了在三乙胺(TEA)-HFIP流动相体系下两种Ladder的LC-UV叠加色谱图。尽管这些采用不同孔径吸附剂的色谱柱对长度不超过60 mer的寡核苷酸表现相似的色谱分离度，但与孔径130 Å的色谱柱相比，使用300 Å的大孔径色谱柱时，70、80、90和100 mer寡核苷酸的分离效果明显改善。孔径130 Å的色谱柱将70 mer和80 mer寡核苷酸分离为一组峰，将90 mer和100 mer寡核苷酸分离为一组峰，峰对中的各组分仅得到部分分离。但是，两种色谱柱均分离出预期数量的寡核苷酸峰，10~60 Ladder分离出8个峰，20~100 Ladder分离出9个峰。重要的是，由于使用了大孔径色谱柱，短链寡核苷酸的分离度也不会受到任何影响。有趣的是，即使每种Ladder单独进样，两种Ladder中相同的寡核苷酸标准品（20、30、40、50和60 mer）仍然表现出几乎相同的保留时间。这种可重现的行为非常适合检测多个样品中的相同分析物，例如寡核苷酸治疗药物开发、DMPK研究和生物分析等情况。每个色谱峰对应的寡核苷酸组分通过采集的电喷雾质谱图得到了确认（未展示相关数据）。正如预期所料，与大孔径吸附剂的色谱柱相比，130 Å孔径的色谱柱产生的保留时间更长，这可能是由于其他研究中提出的，该色谱柱具有更高的孔表面积¹²。

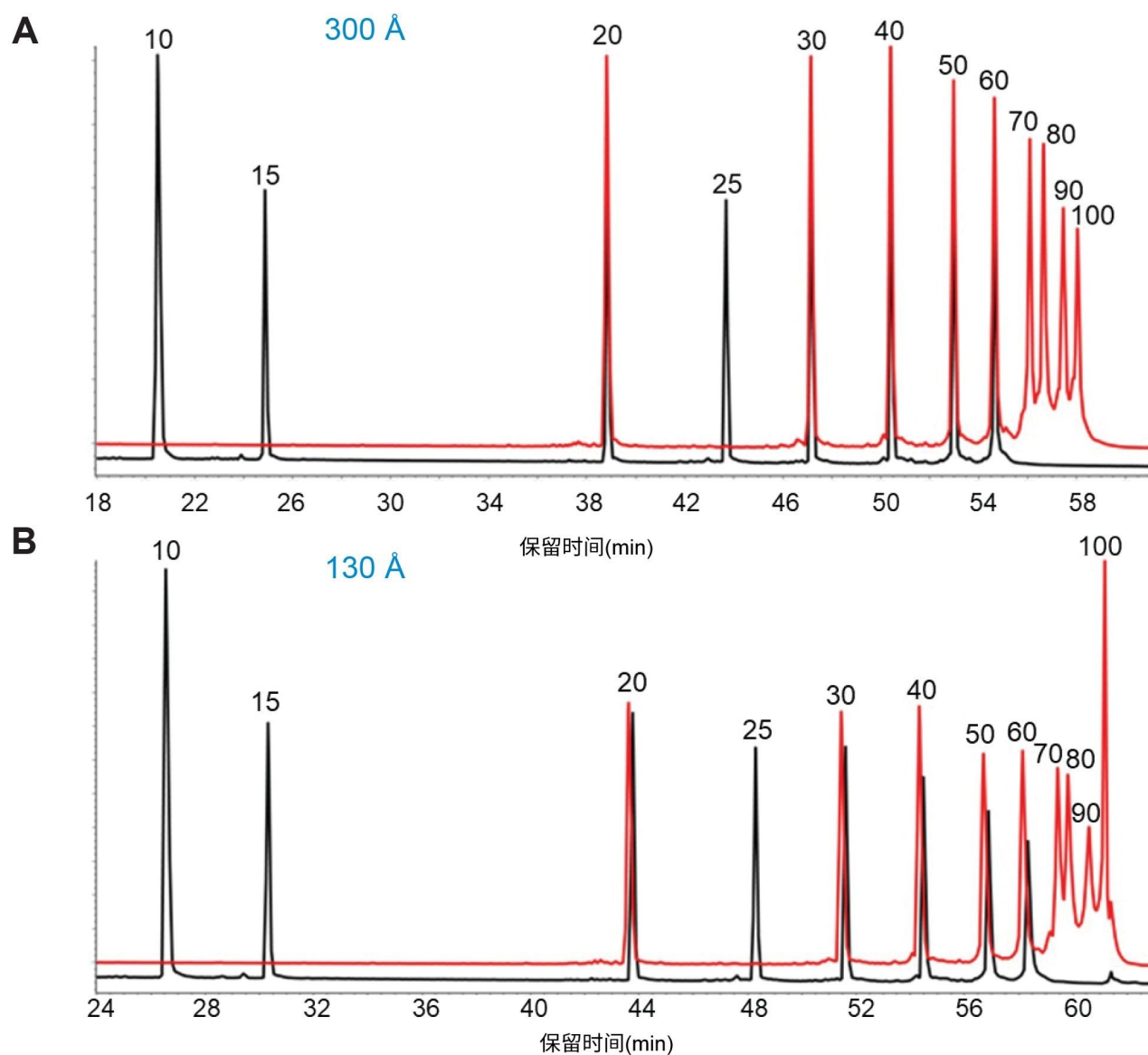


图1.使用300 Å (A)和130 Å (B)孔径的ACQUITY Premier BEH C₁₈色谱柱对单链DNA寡核苷酸Ladder（黑色迹线：10~60 Ladder，红色迹线：20~100 Ladder）的分离结果比较。图中所示为在TEA-HFIP流动相体系下获得的寡核苷酸Ladder的IP-RPLC-UV色谱图。各峰分别标注了相应的核苷酸长度。

图2展示了在300 Å孔径的色谱柱上使用二异丙基乙胺(DIPEA)-HFIP流动相进行IP-RP-LC-MS分析后得到的10~60 mer和20~100 mer Ladder的色谱图。该流动相体系使70 mer、80 mer、90 mer和100 mer DNA ladder组分的分离度略有提高。这表明该色谱柱在多种流动相体系中都能发挥稳定的分离性能。使用DIPEA可略微提高色谱分离

度，从而获得更高质量的MS数据¹³。

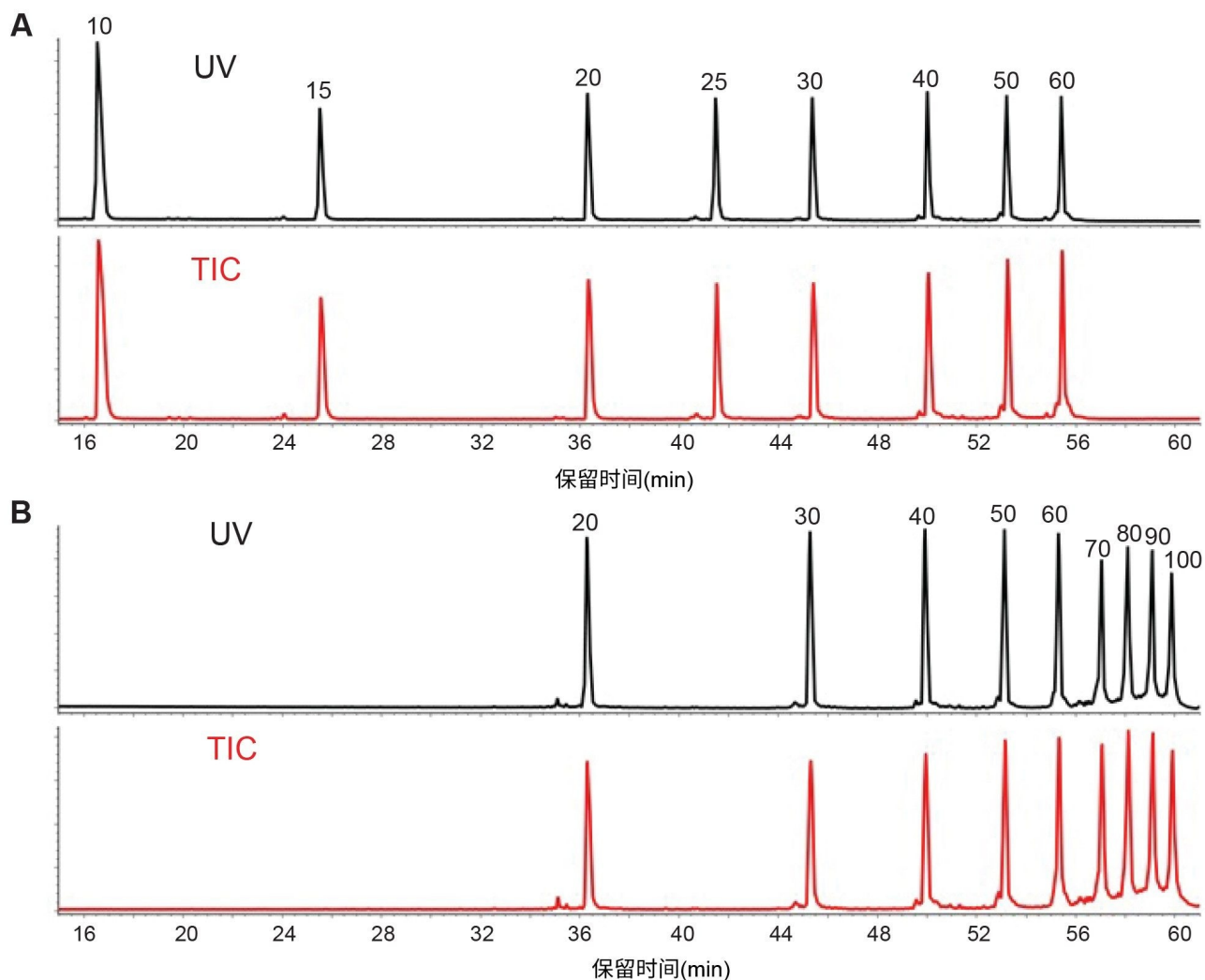


图2.使用ACQUITY Premier BEH C₁₈ 300 Å 1.7 μm寡核苷酸分析专用柱在DIPEA-HFIP流动相体系下获得的寡核苷酸 Ladder (A: ssDNA 10~60 Ladder, B: ssDNA 20~100 Ladder) 的IP-RPLC-UV-MS色谱图。黑色迹线表示UV色谱图，红色迹线表示TIC。各峰分别标注了相应的核苷酸长度。

分离的寡核苷酸峰的质量数测量结果如图3和表2所示。图3显示了90 (59.12 min, MW 27,778)和100mer (59.90 min, MW 30,892) ssDNA ladder组分对应的色谱峰的电喷雾离子系列质谱图。对每张谱图进行完整质量数分析的结果表明，中性质量数值与预期的平均质量数值一致性良好（质量数误差<60 ppm）。

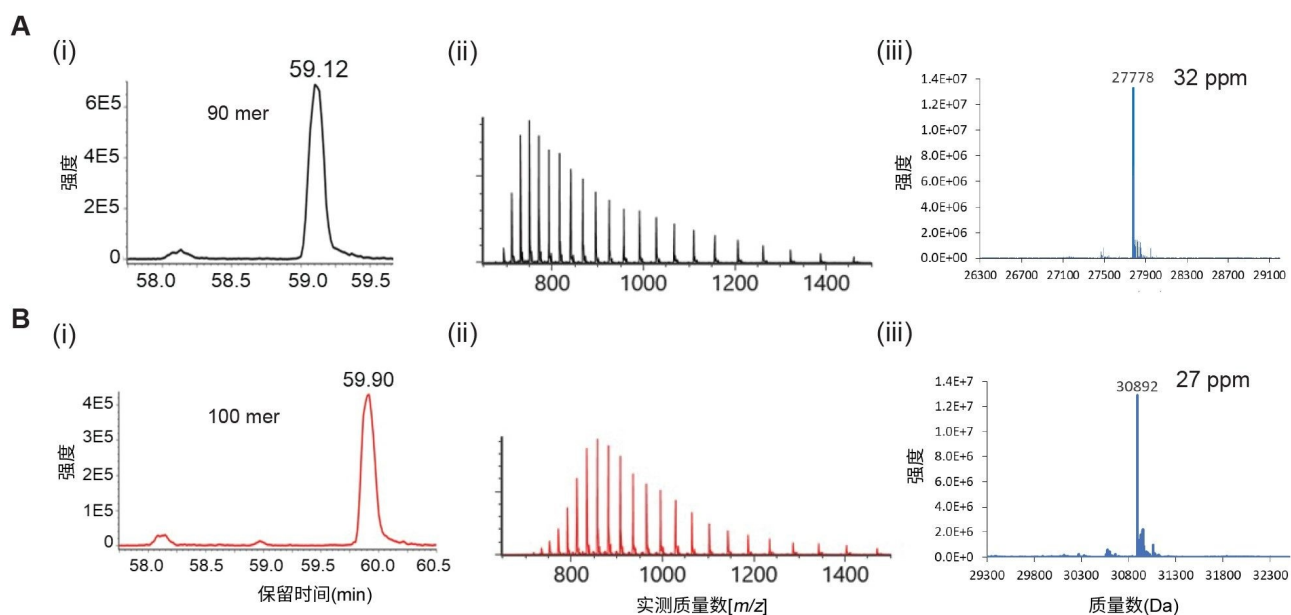


图3.ssDNA 20~100 Ladder中90 mer (A)和100 mer (B)寡核苷酸组分的完整质量数分析LC-MS谱图。使用 *waters_connect*的Intact Mass应用程序对多电荷态离子的电喷雾系列谱图进行去卷积，得到中性质量数值。图中显示了色谱峰(i)、质谱图(ii)和去卷积质量数值(iii)。质量误差以ppm为单位。

样品	DNA成分	单同位素质量数 (Da)	平均质量数 (Da)	实验完整质量数 (Da)	质量数误差 (ppm)
10-60 Ladder	10 mer	3041.544	3043.046	3041.666	40
	15 mer	4631.799	4634.059	4631.959	35
	20 mer	6114.05	6117.045	6114.403	58
	25 mer	7638.297	7642.032	7638.717	55
	30 mer	9186.555	9191.044	9186.353	-22
	40 mer	12268.073	12274.06	12268.370	24
	50 mer	15371.573	15379.07	15380.000	60
	60 mer	18484.085	18493.09	18494.000	49
20-100 Ladder	20 mer	6114.05	6117.045	6114.354	50
	30 mer	9186.555	9191.044	9186.353	-22
	40 mer	12268.073	12274.06	12268.370	24
	50 mer	15371.573	15379.07	15380.000	60
	60 mer	18484.085	18493.09	18494.000	49
	70 mer	21611.596	21622.13	21623.000	40
	80 mer	24700.097	24712.13	24713.000	35
	90 mer	27763.591	27777.11	27778.000	32
	100 mer	30876.103	30891.14	30892.000	28

表2.使用ACQUITY Premier BEH C₁₈ 300 Å 1.7 μm寡核苷酸分析专用柱在DIPEA-HFIP流动相体系下获得的电喷雾离子系列质谱图的去卷积质量数值。将waters_connect平台的Intact Mass应用程序生成的中性质量数值与寡核苷酸的单同位素质量数（浅蓝色阴影）或平均质量数（浅绿色）相比较，以ppm为单位计算质量数误差。

表2展示了使用waters_connect平台的Intact Mass应用程序对质谱图进行去卷积后得到的单个寡核苷酸的完整质量数值。检查发现，这些去卷积质量数值与长度不超过40 mer (MW 12,268)的寡核苷酸的单同位素质量数以及50 mer DNA (MW 15,380)以上的平均质量数具有更高的匹配趋势。这一观察结果证实，BioAccord LC-MS系统及其RDa质谱仪往往会产生大约10,000的质量分辨率。

最后，我们评估了UV检测器响应，发现每种Ladder的三次独立进样结果具有高重现性，RSD值<3%（图4）。

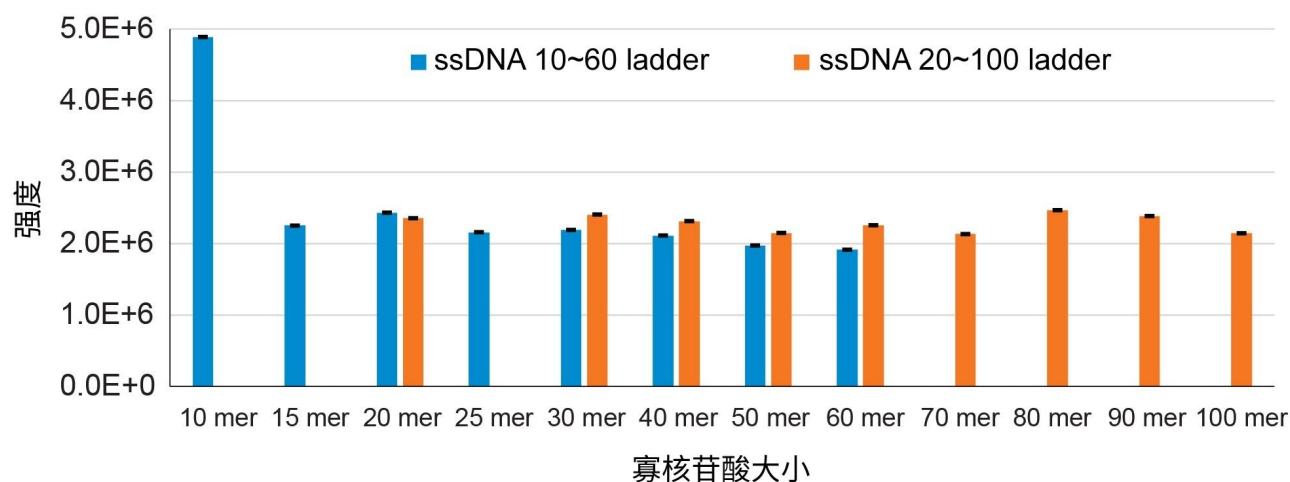


图4. 每种Ladder进样三次所得的各寡核苷酸可重现的TUV检测器响应。蓝色条柱表示ssDNA 10~60 Ladder中各组分的响应，橙色条柱表示ssDNA 20~100 Ladder中相同组分的响应。所有测量结果的检测器响应RSD均保持<3%。

结论

ACQUITY Premier BEH C₁₈, 300 Å寡核苷酸分析专用柱改善了长链寡核苷酸分析物的分离度，与此同时，短链寡核苷酸的出色分离度得以保留。两种新型LC有证标准物质的推出使我们能够快速确认此类色谱柱是否适用于两种不同的离子对流动相体系。无论样品来源如何，具有相同大小和核苷酸组成的寡核苷酸均表现出相同的保留时间，表明这些方法非常适用于峰追踪和峰鉴定应用。最终，本文所述的高峰容量色谱柱与符合法规要求的BioAccord LC-MS系统相结合，显著简化了长度为100个核苷酸（甚至可能更长）的寡核苷酸的深度分析。

参考资料

1. Goyon, A., P. Yehl, and K. Zhang, Characterization of Therapeutic Oligonucleotides by Liquid Chromatography. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2020.182: p. 113105.
2. Demelenne, A., *et al.*, Analytical Techniques Currently Used in the Pharmaceutical Industry for the

- Quality Control of RNA-Based Therapeutics and Ongoing Developments. *Journal of Chromatography A*, 2021.1651: p. 462283.
3. Donegan, M., J.M. Nguyen, and M. Gilar, Effect of Ion-Pairing Reagent Hydrophobicity on Liquid Chromatography and Mass Spectrometry Analysis of Oligonucleotides. *Journal of Chromatography A*, 2022.1666: p. 462860.
 4. Fornstedt, T. and M. Enmark, Separation of Therapeutic Oligonucleotides Using Ion-Pair Reversed-Phase Chromatography Based on Fundamental Separation Science. *Journal of Chromatography Open*, 2023.3: p. 100079.
 5. Apffel, A., *et al.*, New Procedure for the Use of High-Performance Liquid Chromatography–Electrospray Ionization Mass Spectrometry for the Analysis of Nucleotides and Oligonucleotides. *Journal of Chromatography A*, 1997.777(1): p. 3–21.
 6. Gilar, M., *et al.*, Ion-Pair Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography Analysis of Oligonucleotides: Retention Prediction. *Journal of Chromatography A*, 2002.958(1): p. 167-182.
 7. Huber, C.G., P.J. Oefner, and G.K. Bonn, High-Resolution Liquid Chromatography of Oligonucleotides on Nonporous Alkylated Styrene-Divinylbenzene Copolymers. *Analytical Biochemistry*, 1993.212(2): p. 351-358.
 8. Martin Gilar, K.J.F., Yeva Budman, Jeffrey L. Holyoke, Hamid Davoudi, and John C. Gebler, Characterization of Therapeutic Oligonucleotides Using Liquid Chromatography With On-Line Mass Spectrometry Detection. *Oligonucleotides*, 2003.13(4): p. 229-243.
 9. Erb, R. and H. Oberacher, Comparison of Mobile-Phase Systems Commonly Applied in Liquid Chromatography-Mass Spectrometry of Nucleic Acids. *ELECTROPHORESIS*, 2014.35(9): p. 1226-1235.
 10. McGinnis, A.C., E.C. Grubb, and M.G. Bartlett, Systematic Optimization of Ion-Pairing Agents and Hexafluoroisopropanol for Enhanced Electrospray Ionization Mass Spectrometry of Oligonucleotides. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 2013.27(23): p. 2655-2664.
 11. Wang, Y., *et al.*, A Theoretical Study of the Separation Principle in Size Exclusion Chromatography. *Macromolecules*, 2010.43(3): p. 1651-1659.
 12. Bagge, J., *et al.*, Impact of Stationary-Phase Pore Size on Chromatographic Performance Using
-

Oligonucleotide Separation as a Model. *Journal of Chromatography A*, 2020.1634: p. 461653.

13. Croley, T.R., *et al.*, The Chromatographic Role in High Resolution Mass Spectrometry for Non-targeted Analysis. *Journal of The American Society for Mass Spectrometry*, 2012.23(9): p. 1569-1578.

特色产品

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

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

ACQUITY UPLC可变波长紫外检测器 <<https://www.waters.com/514228>>

ACQUITY RDa检测器 <<https://www.waters.com/waters/nav.htm?cid=135077027>>

720007926ZH, 2023年5月



© 2023 Waters Corporation. All Rights Reserved.

[使用条款](#) [隐私](#) [商标](#) [招聘](#) [Cookie](#) [Cookie设置](#)

沪ICP备06003546号-2 京公网安备 31011502007476号