

## 使用 Agilent Pro iQ Plus 和无需离子对试剂的替代方法分析寡核苷酸



### 作者

Lee Bertram 和 Brian Rivera  
安捷伦科技有限公司

### 摘要

本应用简报介绍了使用 Agilent InfinityLab Pro iQ Plus LC/MS 系统对合成寡核苷酸进行中高通量分子确认的实用方法。传统的离子对反相液质联用 (LC/MS) 方法通常需要专用仪器以及昂贵且有毒的试剂。本文介绍了一种基于碳酸氢铵的方法，无需使用离子对试剂也可获得足够的色谱保留能力和出色的质谱灵敏度。Agilent OpenLab CDS MS 谱图解卷积简化了数据分析工作流程，可实现自动化处理，只需极少的优化操作。该方法可对各类寡核苷酸（包括反义寡核苷酸和 siRNAs）实现强大的 LC/MS 分析。

前言

寡核苷酸是一种新型治疗模式，主要通过沉默或降解 mRNA 来靶向调控基因表达。确定 mRNA 靶点后，需要对反义序列进行化学修饰，以改善其药代动力学特性<sup>[1]</sup>、提高结合亲和力，同时尽可能减少脱靶或错配<sup>[2]</sup>。

离子对反相 LC/MS 常用于确认目标寡核苷酸序列的分子量，以确保合成的准确性。然而，该方法使用烷基胺作为离子对试剂，通常需要使用专用仪器。此外，为优化色谱分离和质谱灵敏度，还需要使用有毒且昂贵的全氟醇类化合物，例如 HFIP（六氟异丙醇）。

本研究采用另一种反相方法进行寡核苷酸分子量确认。该方法使用碳酸氢铵代替了离子对试剂，同时仍提供了足够的色谱保留能力和出色的质谱灵敏度。通过对三种不同的反义寡核苷酸进行二十次重复进样，以及对一种 siRNA 进行五次重复进样，验证了方法的适用性和重现性。

实验部分

仪器配置

本实验采用以下仪器配置：

- Agilent InfinityLab Pro iQ Plus LC/MS 系统 (G6170A)
- Agilent Infinity II 1290 生物二元泵 (G7120A)
- Agilent Infinity II 1290 生物 Multisampler (G7167B)
- Agilent Infinity II 1290 生物柱温箱 (G7116B)
- Agilent Infinity II 1260 二极管阵列检测器 HS (G7117C)

虽然本次分析采用的是 Infinity II 液相色谱配置，但使用 Infinity III 液相色谱系统仍可获得相当的结果，且无需改变方法参数。

样品前处理

用去离子水 (DI) 将所有样品重悬，得到 50 μM 的溶液，并在 -80 °C 下保存。分析前，将样品转移至聚丙烯样品瓶中，置于控温自动进样器中保存，最多可保存两天。寡核苷酸样品序列如表 1 所示。

表 1. 寡核苷酸样品序列

寡核苷酸名称	长度	序列
ASO-1	18	dU/MOErC//MOErA//MOErC/dUdUdU/MOErC//MOErA/dU/MOErA//MOErA/dU/MOErG/CdU/MOErG/G
ASO-2	20	dU/MOErC/dUdU/MOErG/TT/MOErA//MOErC//MOErA//MOErT//MOErG//MOErA//MOErA//MOErA/dU/MOErC//MOErC//MOErC/C
Fomivirsen	21	G*C*G*T*T*T*G*C*T*C*T*T*T*C*T*T*G*C*G
Givosiran	22 S	mC*mA*mGmAmAmAfGmUfGmUfCmUfCmAmUmCmUmUmA/L96/
	23 AS	mU*mG*mGfUmCfUmUfUfCmUfCfAmCfAmGfAmGfUmAmGfA*fA*mU

代码	描述
/MOErA/	甲氧基乙氧基 A
/MOErC/	甲氧基乙氧基 C
/MOErT/	甲氧基乙氧基 T
/MOErG/	甲氧基乙氧基 G
dU	脱氧尿苷
fA	2-氟腺苷
fC	2-氟胞苷
fG	2-氟胍
fU	2-氟尿苷
*	硫代磷酸酯键
A	2'-脱氧核糖腺嘌呤
C	2'-脱氧核糖胞嘧啶
G	2'-脱氧核糖鸟嘌呤
T	2'-脱氧核糖胸腺嘧啶
mA	2'-O-甲基 A
mC	2'-O-甲基 C
mG	2'-O-甲基 G
mU	2'-O-甲基 U
rA	核糖腺嘌呤
rC	核糖胞嘧啶
rG	核糖鸟嘌呤
rU	核糖尿嘧啶

LC/MS 分析

Pro iQ Plus 系统的离子源参数如表 2 所示，高效液相色谱 (HPLC) 参数如表 3 所示。

表 2. Agilent Pro iQ Plus 系统的离子源参数

质谱参数	
参数	设定值
MS	Agilent Pro iQ Plus
离子源	安捷伦喷射流电喷雾离子源 (AJS-ESI)
干燥气流量	13.0 L/min
气体温度	300 °C
雾化器压力	35 psi
毛细管电压	3000 V
鞘气温度	250 °C
鞘气流量	11 mL/min
喷嘴电压	1500 V
模式	正
扫描	<i>m/z</i> 700-2800
扫描时间	1250 ms
碎裂电压	180 V
增益因子	5

表 3. 使用的 HPLC 参数

参数	设定值
色谱柱	Agilent AdvanceBio 寡核苷酸色谱柱， 2.1 × 50 mm, 2.7 µm
进样器温度	8 °C
UV 检测	260/4 nm（参比 360/20 nm） 峰宽 > 0.1 min (2.5 Hz)
流动相 A	20 mM 碳酸氢铵去离子水溶液
流动相 B	甲醇
流速	0.7 mL/min
进样量	2 µL
多重清洗	20:80 水:甲醇；冲洗口；5 秒 90:10 水:甲醇；冲洗口；3 秒
柱温	75 °C
后运行时间	1.0 min
梯度程序	时间 (min)
	0
	0.1
	3.0
	3.1
	3.5
	3.6
%B	
5	
5	
40	
80	
80	
5	

结果与讨论

早在 1997 年，研究人员就提出了以全氟醇作为酸性调节剂的烷基胺离子对试剂体系，至今仍是寡核苷酸 LC/MS 分析的首选流动相<sup>[3]</sup>。该方案可提供出色的色谱性能和电喷雾效率，尤其是相较于以乙酸盐作为反离子的流动相体系。大量研究进一步证明，这种强大的离子对试剂体系能够为实验设计提供极大的灵活性<sup>[4]</sup>。

然而，在 LC/MS 方法中使用烷基胺和 HFIP 也存在诸多问题。首先，由于寡核苷酸修饰及序列会影响电喷雾解吸和色谱行为，因此必须优化缓冲液成分<sup>[5]</sup>。其次，烷基胺可能会污染离子源和液相色谱系统，如果切换回正离子模式会产生背景峰，因此需要对液相色谱组件和离子源表面进行彻底的清洁/钝化。但即便如此，由于烷基胺会吸附到 LC/MS 系统上，部分实验室可能仍需配置负离子模式专用系统。最后，含烷基胺的流动相若未在氩气环境下密封保存，保质期非常短，因此必须现配现用（有时甚至需每日新鲜配制）以保证方法稳定性。

对于需要分析大量寡核苷酸并进行分子量确认的实验室而言，优化流动相条件可能并不现实。此外，仪器维护和每日新鲜配制缓冲液导致的 LC/MS 停机时间会造成样品积压，这对大多数实验室而言都是重大挑战。采用非离子对反相色谱法将是更实用的解决方案。

近期的一项研究提出了一种比离子对试剂更经济实用的替代方案 — 使用碳酸氢铵 (NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>) 缓冲液和甲醇作为强溶剂<sup>[6]</sup>。该方法在分子量确认方面具有显著优势：即使仅对流动相和梯度进行非常简单的优化，也足以获得较高的 ESI 灵敏度和色谱性能。该研究推测，二氧化碳脱气促进了液滴形成，而氨挥发有助于质子加合，因此可实现正离子模式分析。这一创新方法使实验室无需再专门配置系统用于负离子模式分析。

由于寡核苷酸呈极性并带负电荷，需要考虑这类分析物在没有离子对试剂的情况下能否实现色谱保留或分离。结果表明，基于碳酸氢铵的方法能有效保留多种寡核苷酸，尤其适用于反义寡核苷酸 (ASOs) 等修饰寡核苷酸 (图 1)。本文所述方法为中高通量分析提供了概念验证。将梯度设为流动相 B 在 3 分钟内从 5% 增加到 40%，这种相对“陡峭”的梯度提供了出色的保留能力和峰形，0.7 mL/min 的流速也未对谱图质量和灵敏度产生负面影响。

与大多数具有多个可电离官能团的大分子类似，寡核苷酸在进行 ESI-MS 分析时呈现多电荷离子状态。需要注意的是，根据烷基胺离子对和离子源参数的不同，寡核苷酸的电荷态分布可能会有所不同<sup>[7]</sup>。这在使用易产生高电荷态的加热离子源时会带来问题，可能导致解卷积质谱图出现伪峰甚至鉴定错误。相比之下，碳酸氢铵 (ABC) 倾向于产生电荷态较低的寡核苷酸 (图 2)， $m/z$  值越高，与基质干扰物、杂质或其他成分的谱图重叠就越少，从而提高了解卷积数据的可靠性。

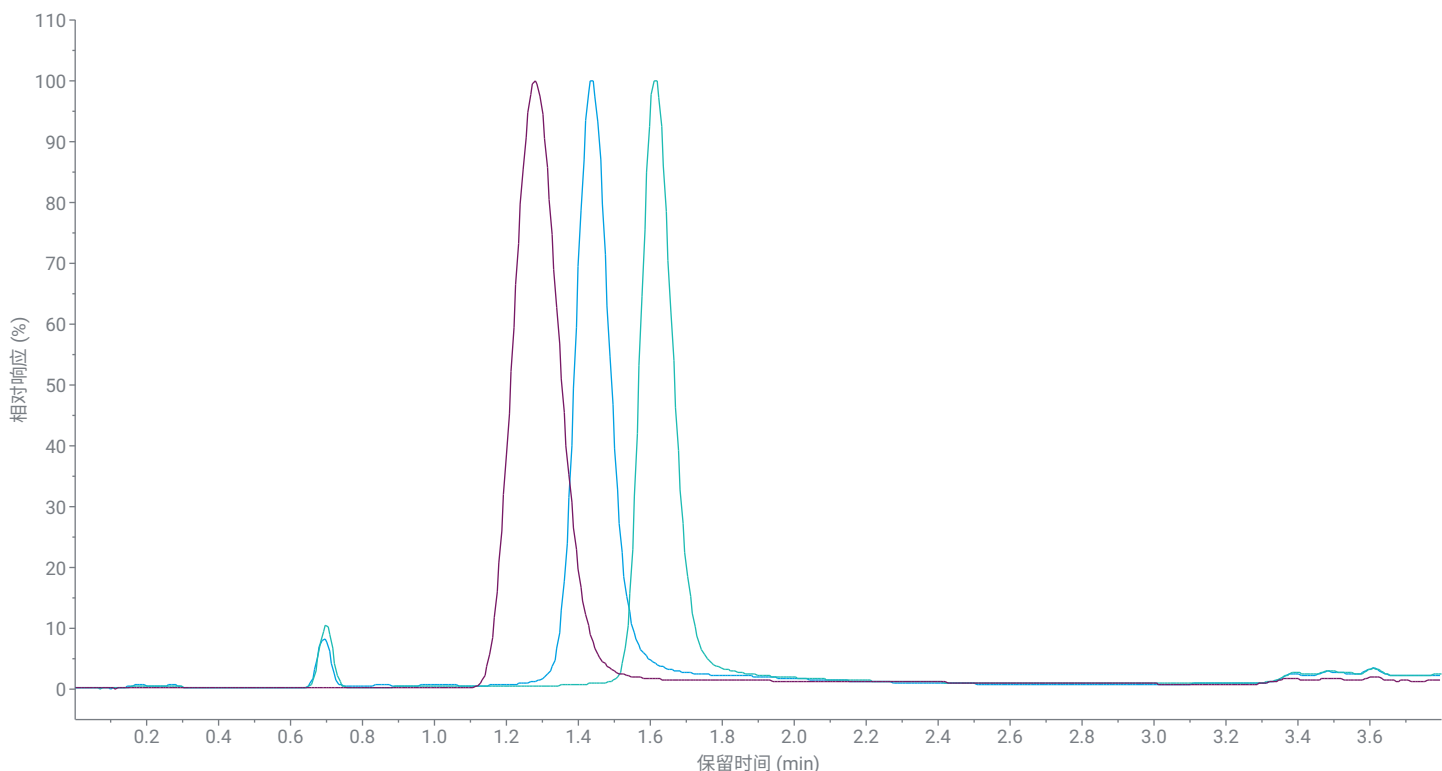


图 1. 三种反义寡核苷酸 (ASOs) 的紫外色谱图。Fomivirsen 是没有 2'-修饰的 21 mer ASO。因此，它比两种更短的完全硫代 2'-修饰的 ASOs 更早洗脱

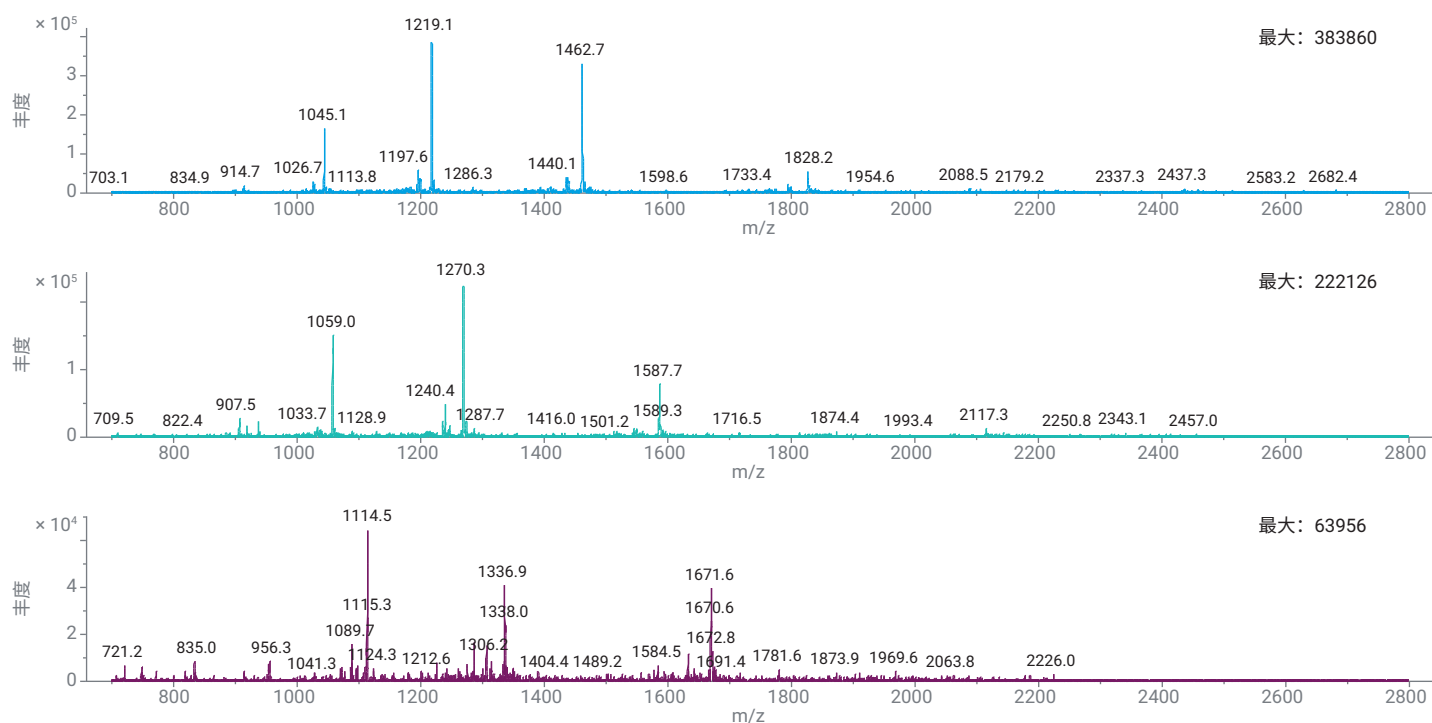


图 2. 样品的全扫描谱图。每种 ASO 的电荷态主要为 4–6

Agilent OpenLab CDS 采用独特的谱图解卷积技术，针对单位质量检测器进行了优化。最大熵值法通过增强谱图中的主要特征峰，同时尽可能降低噪音，计算出最可能的质量数。相比之下，OpenLab CDS 谱图解卷积则根据用户输入的信息识别谱图中的离子，并将它们与目标质量数进行匹配，然后通过线性回归拟合或质心提取计算得到平均分子量。这种简易方法使用通用处理流程即可实现分子量确认，且全自动化运行，几乎无需优化。每个样品重复进样三次，得到的结果几乎相同，相对标准偏差 (%RSDs) < 0.1%。表 4 给出了样品序列采集时所用的自动解卷积参数设置，表 5 汇总了解卷积结果。

表 4. MS 谱图解卷积设置

参数	设定值
自动解卷积设置	
运行自动解卷积	已启用
保留时间窗口	1–2.7 min
TIC 峰类型	所有峰
TIC 前 n 个峰	3
基本设置	
使用 $m/z$ 范围	已禁用
低/高分子量	3000–10000
最大电荷	10
组内最小峰数	3
高级设置	
MW 一致性 (0.01%)	10
绝对噪音阈值	100
相对丰度阈值	10
MW 算法	曲线拟合
MW 算法阈值 (%)	40
分布包迹阈值 (%)	50

图 3 为 ASO-1（具有 2'-MOE 修饰的 18 mer 硫代磷酸酯）的解卷积质谱图。组分 A 为全长产物，与计算出的质量数高度吻合。组分 B 可能为脱嘌呤（鸟嘌呤丢失）。组分 C 推测为钠加合物。如结果所示，InfinityLab Pro iQ Plus 兼具单位质量精度与易于操作的解卷积功能，可以监测寡核苷酸并识别意外杂质或组分。通过高分辨质谱可进行更深入的表征分析。

表 5. 每种 ASO 20 次重复分析得到的解卷积结果

寡核苷酸名称	质量数计算值 (Da)	平均实测质量数 (Da)	Δ 质量数 (Da)
ASO-1	6348.3	6347.9	-0.4
ASO-2	7309.2	7308.8	-0.4
Fomivirsen	6682.4	6681.8	-0.6

为证明该方法的广泛适用性，本研究还分析了双链三天线型 GalNAc 偶联 siRNA (Givosiran)。针对这种双链偶联物，需要对 LC/MS 参数稍作调整：将梯度程序调整为 3 分钟内从 5% 升至 45%，以确保正义链与反义链基线分离；同时，将碎裂电压降至 120 V，以尽可能减少易碎裂寡糖偶联物的源内碎裂。图 4 为 Givosiran 五次进样的紫外色谱叠加图。

尽管未使用离子对试剂，ABC 流动相仍实现了正义链和反义链的基线分离（图 5）。这种基线分离很有必要，因为任何谱图重叠都可能导致解卷积过程中鉴定出错。质谱图如图 5 所示，其电荷态分布与前文提到的 ASOs 相似。每个峰的解卷积质谱图分析结果表明，反义链比正义链更早洗脱。值得注意的是，正义链可能发生了 GalNAc 丢失（图 6）。Givosiran 的分析结果汇总详见表 6。

表 6. 每次 Givosiran 进样得到的解卷积结果

寡核苷酸名称	质量数计算值 (Da)	平均实测质量数 (Da)	Δ 质量数 (Da)
Givosiran, 反义	7563.8	7563.1	0.7
Givosiran, 正义	8736.5	8735.6	0.9

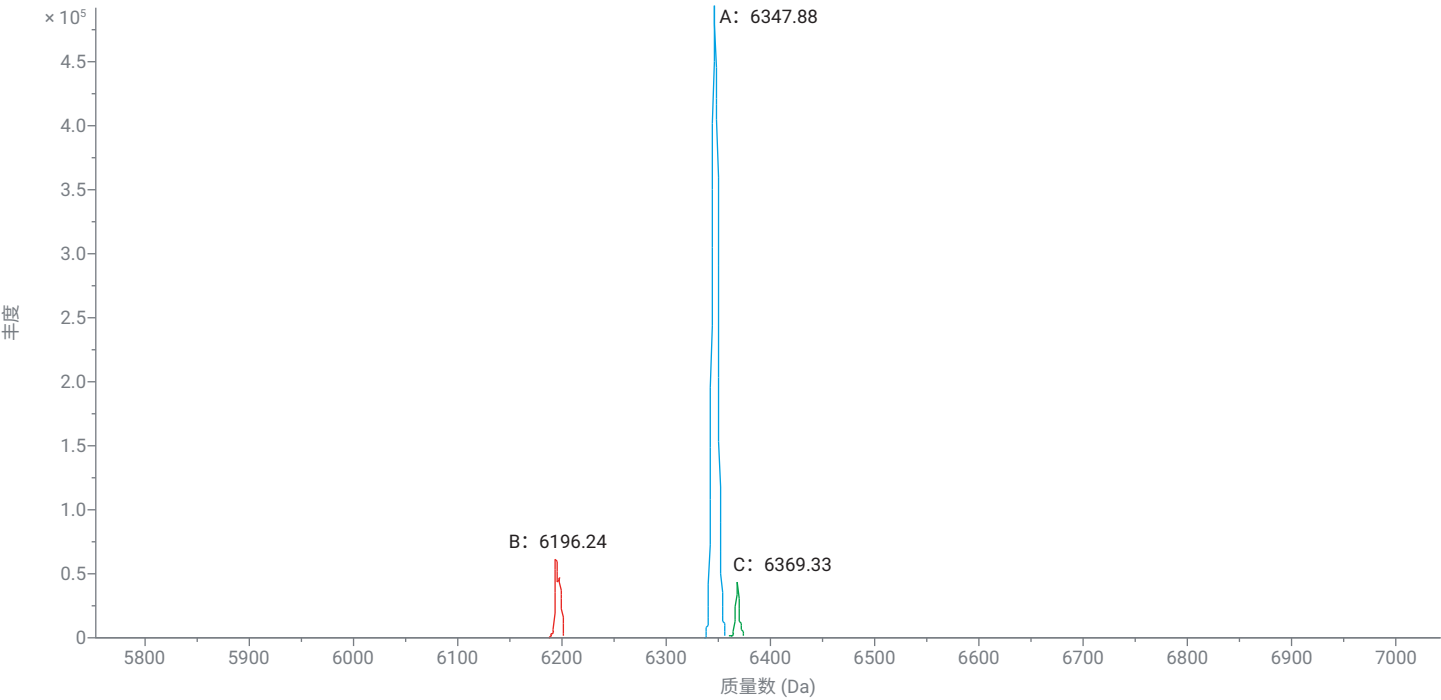


图 3. ASO-1 的解卷积谱图

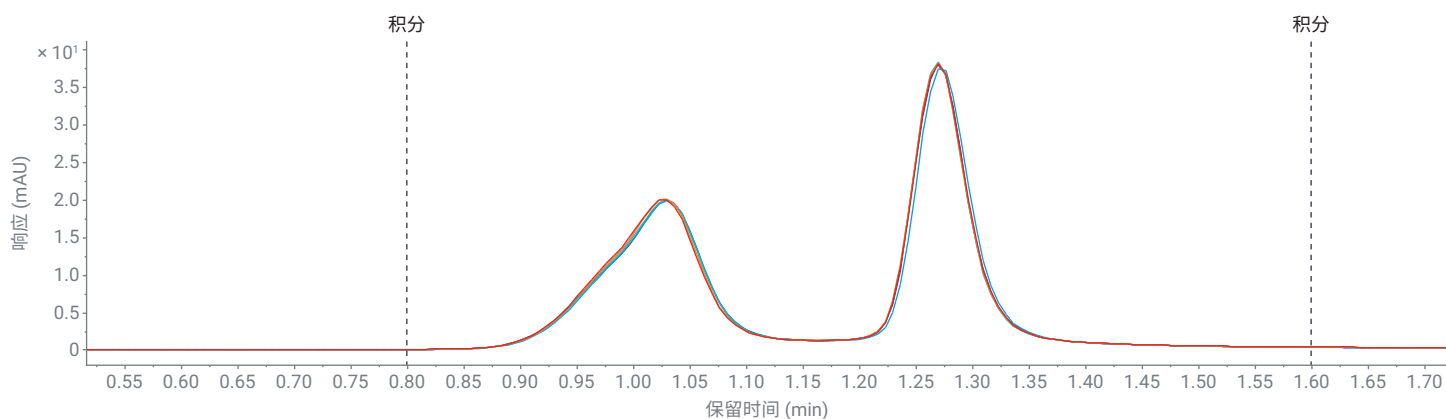


图 4. Givosiran 五次进样的紫外色谱叠加图

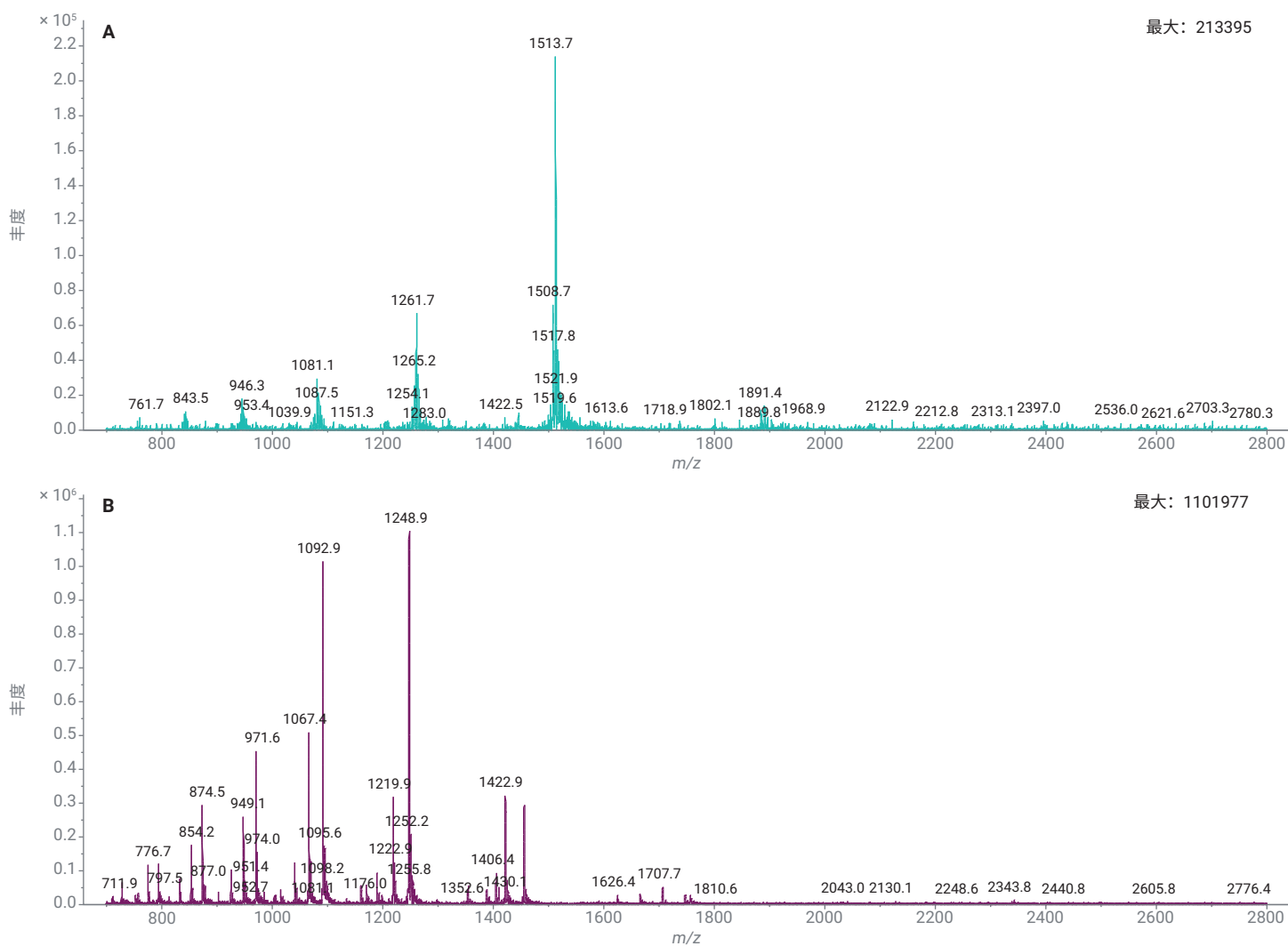


图 5. 反义 RNA 链 (A) 和正义 RNA 链 (B) 的质谱图。电荷态分布与使用类似方法分析反义寡核苷酸得到的电荷态分布相似。反义链以 5- 电荷态为主, 而 GalNAc 偶联的正义链则以 6- 电荷态为主

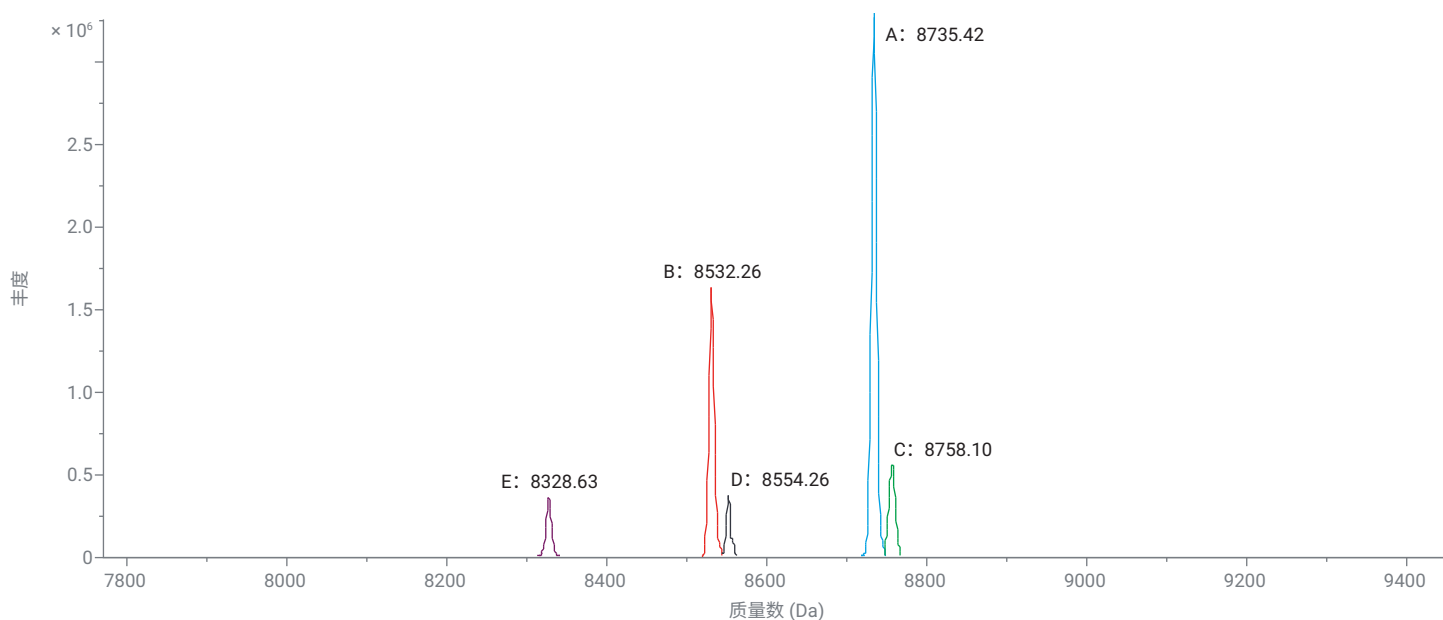


图 6. Givosiran 正义链的解卷积质谱图。观测到约 200 Da 的质量偏移，可能与 GalNAc 丢失有关

## 结论

本应用简报中介绍的方法为合成寡核苷酸的中高通量分子确认提供了一种实用解决方案。Agilent Pro iQ Plus 作为一款单位质量检测器具有卓越的分辨率与灵敏度，即使在超出许多单四极杆检测器能力范围的高  $m/z$  区间内性能依然优异。该方法采用新型碳酸氢铵流动相，为实验室分析多种类型的寡核苷酸（包括反义寡核苷酸和 siRNAs）提供了所需的 LC/MS 性能。本应用简报中展示的 LC 和 MS 结果具有良好的重现性。此外，Agilent OpenLab CDS 的质谱解卷积功能简化了数据分析工作流程，并且支持无人值守的自动化处理，只需极少的优化操作。



## 参考文献

1. Herkt, M.; Thum, T. Pharmacokinetics and Proceedings in Clinical Application of Nucleic Acid Therapeutics. *Mol. Ther.* **2021**, 29(2), 521–539. DOI: 10.1016/j.ymthe.2020.11.008
2. Watts, J. K.; Corey, D. R. Silencing Disease Genes in the Laboratory and the Clinic. *J. Pathol.* **2012**, 226(2), 365–379. DOI: 10.1002/path.2993
3. Apffel, A.; Chakel, J. A.; Fischer, S.; Lichtenwalter, K.; Hancock, W. S. Analysis of Oligonucleotides by HPLC – Electrospray Ionization Mass Spectrometry. *Anal. Chem.* **1997**, 69(7), 1320–1325. DOI: 10.1021/ac960916h
4. Guimaraes, G. J.; Bartlett, M. G. The Critical Role of Mobile Phase pH in the Performance of Oligonucleotide Ion-Pair Liquid Chromatography-Mass Spectrometry Methods. *Future Sci. OA* **2021**, 7(10), FSO753. DOI: 10.2144/fsoa-2021-0084
5. Basiri, B.; Murph, M. M.; Bartlett, M. G. Assessing the Interplay Between the Physicochemical Parameters of Ion-Pairing Reagents and the Analyte Sequence on the Electrospray Desorption Process for Oligonucleotides. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2017**, 28(8), 1647–1656. DOI: 10.1007/s13361-017-1671-6
6. Hayashi, Y.; Sun, Y. Overcoming Challenges in Oligonucleotide Therapeutics Analysis: A Novel Nonion Pair Approach. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2024**, 35(9), 2034–2037. DOI: 10.1021/jasms.4c00270
7. Chen, B.; Mason, S. F.; Bartlett, M. G. The Effect of Organic Modifiers on Electrospray Ionization Charge-State Distribution and Desorption Efficiency for Oligonucleotides. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2013**, 24(2), 257–264. DOI: 10.1007/s13361-012-0509-5

查找当地的安捷伦客户中心：

[www.agilent.com/chem/contactus-cn](http://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](mailto:LSCA-China_800@agilent.com)

在线询价：

[www.agilent.com/chem/erfq-cn](http://www.agilent.com/chem/erfq-cn)

[www.agilent.com](http://www.agilent.com)

DE-006128

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，2025  
2025年5月6日，中国出版  
5994-8337ZHCN