

# 用于寡核苷酸 LC/UV 和 LC/MS 分析 的不同离子对试剂的评估

## 作者

Gerd Vanhoenacker,  
Cindy Lecluyse, Griet Debyser,  
Pat Sandra, Koen Sandra  
RIC Biologics  
比利时

Sonja Schipperges,  
Sonja Schneider, Udo Huber  
安捷伦科技有限公司  
德国

## 摘要

本文研究了各种离子对试剂（胺类和酸性反离子）对寡核苷酸 (ON) 的 LC/UV 和 LC/MS 分析的影响。胺的类型和反离子的浓度对 ON 的保留和分离具有显著影响，并会严重影响 MS 数据。电荷态和加合物的形成受流动相组成的影响。本应用简报表明，许多变量可用于优化 ON 的分析条件。使用结合 DAD 紫外检测的 Agilent 1290 Infinity II 液相色谱系统和 Agilent 6530 LC/Q-TOF 执行分析。

## 前言

越来越多的合成 ON 被开发出来，并用于治疗各种疾病。这些治疗药物主要为核酸碱基、核糖或脱氧核糖（分别为 RNA 或 DNA）以及磷酸的短链线性聚合物<sup>[1,2]</sup>。ON 具有不同的大小和形式，通常通过化学修饰来改变或增强治疗效果、增加对特定靶点的特异性、提高稳定性，或改善给药和摄取等。ON 种类繁多，因此产生了各种不同的分类，例如小干扰 RNA (siRNA)、microRNA (miRNA)、反义寡核苷酸 (ASO) 和适配体等。

ON 的生产通常采用多步骤工艺，通过逐个添加核苷酸将链延长到预定长度（即核苷酸数量 (n)）。合成可以通过不同的方式进行，通常需要使用支持基底和保护基团。ON 合成中涉及的所有步骤都可能产生杂质。常见的杂质包括反应不完全产生的短链物质（例如 n-1、n-2）。目标 ON 的收率随着循环次数的增加而降低。此外，还可能形成长链物质（例如 n+1）以及由脱氨、脱嘌呤、氧化（通常是鸟嘌呤）和其他不良反应生成其他杂质。除了生产过程中引入的杂质外，ON 的储存也会产生降解产物。

由于化合物本身的特性和分子量的差异，ON 的分析（例如主产物的分析、纯度的测定、杂质的定量和鉴定）存在挑战。

最近发表了一篇关于合成 ON 的类型及其 LC 分析的全面综述<sup>[1]</sup>。ON 本质上为强极性产物，携带多个阴离子基团（通常每个核苷酸上有一个磷酸基团）。当 ON 未经修饰或化学修饰对总体极性的影响较小（通常情况下是这样）时，常规的反相 LC 无法实现足够的保留，必须应用替代模式进行分析。多种液相色谱模式（例如阴离子交换色谱 (AEX)、亲水相互作用液相色谱 (HILIC)、混合模式色谱 (MMC)、离子对液相色谱 (IPLC) 和体积排阻色谱 (SEC) 等）可用于表征 ON<sup>[1,2]</sup>。在某些情况下，将上述模式组合用于多维设置。这可以通过全二维液相色谱<sup>[3]</sup> 或（多）中心切割二维液相色谱设置实现<sup>[4]</sup>。根据所需的分析 (QA/QC 或研发)，应用基于 UV 的检测器和/或质谱仪。

IPLC 是目前应用最多的 ON 分析的液相色谱模式。在 IPLC 中，结合使用反相固定相与含有离子对试剂的流动相。这些试剂通常为胺类，与阴离子型 ON 相互作用形成疏水对。然后，这种疏水对可以保留在反相柱上，根据 ON 的长度、类型以及是否存在化学修饰而发生分离。

选择合适的流动相关键重要。用水将胺离子对试剂和酸性反离子以确定的浓度和比例混合，制备得到流动相。这种组合将实

现所需的 ON 保留。使用甲醇和乙腈等有机改性剂可以促进洗脱，而梯度洗脱则可以提供理想的分离能力。给定样品的结果由所选固定相、流动相添加剂的浓度和类型、柱温以及样品性质的复杂相互作用决定。流动相组成不仅会影响色谱分析：当使用 LC/MS 时，还会严重影响 MS 数据（灵敏度、电荷态、加合离子等）。

不同的团队研究了流动相组成对 ON 色谱和质谱行为的影响<sup>[5-9]</sup>。通过仔细开发方法可以显著提高分离度和灵敏度。然而，要确定一组能够为一大类 ON 提供理想性能的通用条件似乎并不可行。对于每种 ON，可通过优化离子对试剂类型和浓度、反离子类型和浓度以及两种添加剂的浓度比，尽可能改善分离和 MS 检测。

本应用简报展示了使用 Agilent AdvanceBio 寡核苷酸色谱柱和各种流动相获得的结果。使用具有二极管阵列检测 (DAD) 功能的 1290 Infinity II 液相色谱系统和 6530 LC/Q-TOF 执行分析。使用 DNA 和 RNA ON 参比样品和选定的治疗性 ON 评估了不同流动相组合对色谱和质谱分析结果的影响。数据表明，在 ON 分析中较为常用的流动相有可行的替代品。这些替代品不仅性能相当或更出色，而且还可以显著降低运行成本。

## 实验部分

### 材料

以下胺类和酸类购自 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA): 三乙胺 (TEA)、正丁胺 (BA)、二丁胺 (DBA)、正己胺 (HA)、乙酸三乙胺 (TEAA)、乙酸 (AA) 和 1,1,1,3,3,3-六氟异丙醇 (HFIP)。乙腈 (HPLC-S)、甲醇 (ULC/MS) 和水 (ULC/MS) 来自 Biosolve (Valkenswaard, The Netherlands)。使用经焦碳酸二乙酯 (DEPC) 处理的水 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) 稀释样品。

### 样品

- 混标:
  - DNA 分子量标准品 (部件号 5190-9029)
  - RNA 分离度标准品 (部件号 5190-9028)
- 样品:
  - 治疗性 ON 来自当地一家生物技术公司

### 流动相配制

乙酸盐流动相为乙酸和相应胺的等摩尔溶液。为了配制 500 mL 溶液，将乙酸加入约 450 mL 水中并混匀。加入相应的胺并混匀，然后加水至 500 mL。通过加入少量乙酸或相应的胺，仔细调节溶液的 pH 值。

100 mmol/L TEAA, pH 7	乙酸: 3 g 三乙胺: 5.06 g
100 mmol/L HAA, pH 7	乙酸: 3 g 己胺: 5.06 g
100 mmol/L DBAA, pH 7	乙酸: 3 g 二丁胺: 6.46 g

HFIP 流动相的配制方法如下。为了配制 500 mL 溶液，将规定量的 HFIP 加入约 400 mL 水中并混匀。加入相应的胺并混匀，然后加水至 500 mL。这些流动相在使用时均未调节 pH。

15 mmol/L TEAA/400 mmol/L HFIP pH 7.8–7.9	HFIP: 33.6 g 三乙胺: 0.759 g
15 mmol/L TEAA/100 mmol/L HFIP pH 8.6–8.7	HFIP: 8.4 g 三乙胺: 0.759 g
15 mmol/L TEAA/25 mmol/L HFIP pH 9.4–9.6	HFIP: 2.1 g 三乙胺: 0.759 g
15 mmol/L HA/25 mmol/L HFIP pH 9.4–9.6	HFIP: 2.1 g 己胺: 0.759 g
15 mmol/L DBA/25 mmol/L HFIP pH 9.4–9.6	HFIP: 2.1 g 二丁胺: 0.969 g

### 样品前处理

- 将 DNA 分子量标准品 (部件号 5190-9029) 溶于 1 mL DEPC 水中
- 将 RNA 分离度标准品 (部件号 5190-9028) 溶于 1 mL DEPC 水中
- 用 DEPC 水制备和稀释样品

### 仪器

结合使用 Agilent 1290 Infinity II 液相色谱系统与 Agilent 6530 LC/Q-TOF。

- Agilent 1290 Infinity II 高速泵 (G7120A)
- Agilent 1290 Infinity II Multisampler (G7167B), 配备样品恒温箱 (选件 101)
- Agilent 1290 Infinity II 大容量柱温箱 (G7116B)
- Agilent 1290 Infinity II 二极管阵列检测器 (G7117B), 配备 10 mm InfinityLab 最大光强卡套式流通池 (G4212-60008)
- Agilent 6530 LC/Q-TOF (G6530A), 配备安捷伦喷射流技术 ESI 离子源

### 软件

- 仅用于 LC-DAD
  - Agilent OpenLab CDS ChemStation C.01.07 SR4 [505] 或更高版本
- 用于 LC-DAD-MS
  - 采集: Agilent MassHunter 仪器控制软件 (B.08.00) 或更高版本
  - 数据分析: Agilent MassHunter 定性分析软件 (B.07.00) 或更高版本

## 通用方法设置

### LC-DAD

参数	值
色谱柱	Agilent AdvanceBio 寡核苷酸色谱柱, 2.1 × 50 mm, 2.7 μm (部件号 659750-702)
流动相 A 和 B	参见结果与讨论部分
梯度	参见结果与讨论部分
流速	0.6 mL/min
柱温	65 °C
检测 (DAD)	260/4 nm (参比 355/20 nm) 峰宽 > 0.025 min (10 Hz)
进样	2 μL (进样针冲洗口, 3 秒, 甲醇)
进样器温度	12 °C

### LC(-DAD)/MS

参数	值
色谱柱	Agilent AdvanceBio 寡核苷酸色谱柱, 2.1 × 50 mm, 2.7 μm (部件号 659750-702)
流动相 A	15 mmol/L 胺/HFIP (25、100 或 400 mmol/L) 的水溶液
流动相 B	甲醇
梯度	参见结果与讨论部分
流速	0.6 mL/min
柱温	65 °C
检测 (DAD)	260/4 nm (参比 355/20 nm) 峰宽 > 0.025 min (10 Hz)
进样	2 μL (进样针冲洗口, 3 秒, 甲醇)
进样器温度	6 °C

### LC/Q-TOF 设置

离子源设置	安捷伦喷射流技术
电离模式	负离子模式
干燥气温度	300 °C
干燥气流速	8 L/min
雾化器压力	35 psig
鞘气温度	350 °C
鞘气流速	8 L/min
喷嘴电压	1000 V
毛细管电压	3500 V
采集设置	
碎裂电压	200 V
质量数范围	400–3200 m/z
采集模式	扩展动态范围模式 (2 GHz)
扫描速率	3 幅谱图/秒
采集	棒状图和轮廓图

## 结果与讨论

### 用于 UV-DAD 检测的胺-乙酸盐流动相

胺-乙酸盐组合是广泛用于 ON 的 LC/UV 分析的流动相添加剂。一般情况下, 使用 100 mmol/L 的水溶液 (胺和乙酸的等摩尔溶液), 并使用乙腈对分析物进行平缓梯度洗脱。最常见的组合是中性 pH 下的 TEAA 缓冲液 (三乙胺 (TEA) 和乙酸)。

虽然 TEAA 是广泛认可的流动相添加剂, 但对于给定的一组 ON, 它并不一定能提供理想性能。因此, 在方法开发过程中, 应考虑使用替代胺类。在图 1 中, 使用多种流动相对 DNA 分子量和 RNA 分离度参比标准品的 LC/UV 分析进行了比较。对每种 TEAA 替代品的梯度进行扩展, 匹配使用 TEAA 获得的保留时间, 以便直接比较色谱性能。

对于参比样品, 乙酸与己胺 (HAA 缓冲液) 或二丁胺 (DBAA 缓冲液) 等替代胺类的组合相较于 TEAA 明显具有更出色的性能。从图 1 中的插图所示的一小段分析细节中可以明显看出替代胺类的分离效率更高。从主峰中检测和分离杂质的能力大大提高。当使用 TEAA 时, DNA 分子量标准品以 10%–14% 的乙腈梯度在 10 分钟内洗脱, 而 RNA 分离度标准品则仅以 6%–8% 的乙腈梯度在 12 分钟内洗脱。由于核糖中存在 2'-羟基, RNA 比 DNA 更早洗脱或所需的有机改性剂明显更少。

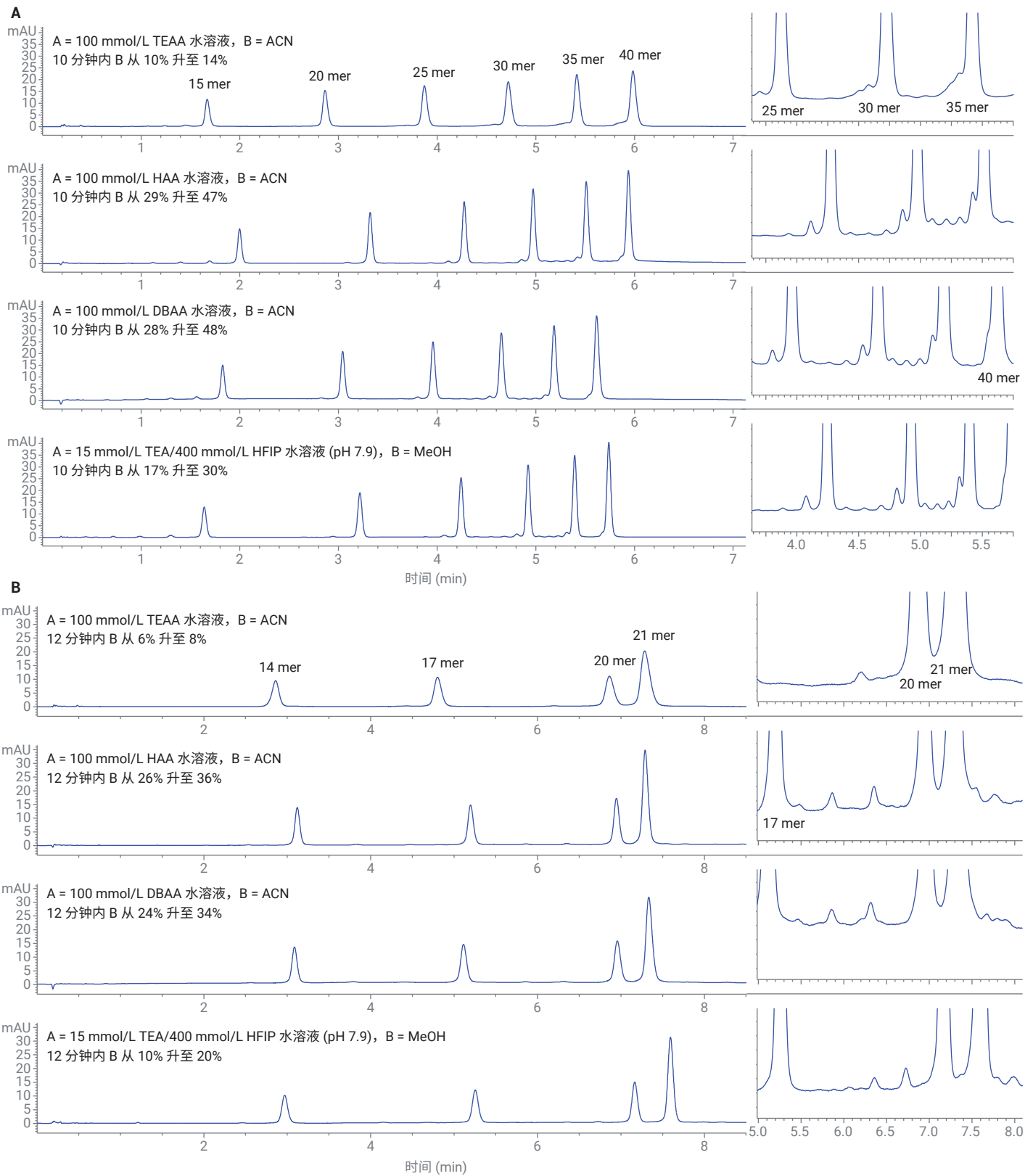


图 1. 在 260 nm 处使用 IPLC 的各种流动相添加剂进行 LC/UV 分析。(A) DNA 分子量标准品; (B) RNA 分离度标准品。流动相梯度如图中所示。其他方法参数见实验部分

采用 HAA 和 DBAA 流动相的 IPLC 对 ON 的保留时间更长，因此在该条件下需要提高有机改性剂含量和梯度陡度。这从本质上解释了性能的提升。从这些数据中可以清楚地看出，对于给定的 ON 应用，评估不同的流动相添加剂是调整分离效果的有用方法。

### 用于 UV 和 MS 检测的胺-HFIP 流动相

TEAA 可用于 ON 的 IPLC/UV 分析，但不适用于负离子电喷雾电离 (ESI) 质谱检测。二十多年前，Apffel 等人<sup>[5,6]</sup>报道了使用 TEAA 流动相的 ESI-MS 灵敏度不够高。由于 HFIP 不溶于乙腈，他们建议将 HFIP 作为酸性反离子，并将甲醇作为有机改性剂。这种方法已成为 ON 的 LC/MS 分析的参考。灵敏度提高的主要原因在于添加剂的挥发性不同。HFIP 的沸点比 TEA 低，在电喷雾过程中，在生成的液滴中，挥发性较高的 HFIP 优先蒸发并耗尽。因此，pH 值升高，在这些碱性条件下，TEA-ON 离子对在离子源中解离，提高了 ON 的可检测性<sup>[6]</sup>。乙酸的挥发性比 TEA 低，因此在 ESI 过程中的去除效率较低。随后，离子对在离子源中解离较少，甚至保持稳定。这对 MS 灵敏度有严重的不利影响。

有趣的是，当与 UV 一起使用时，与 TEAA 相比，TEA-HFIP 组合可以得到进一步改善的色谱性能。从图 1 中也可以清楚地看出这一点，该图将 DNA 分子量标准品和 RNA 分离度标准品的结果与先前报道的胺-乙酸盐组合进行了比较。15 mmol/L TEA 和 400 mmol/L HFIP 的组合是一个常用的起点，性能优于 TEAA，与基于 DBAA 和 HAA 的替代流动相的性能非常相似。TEA-HFIP 流动相的另一个优势在于，与 TEAA 相比，序列依赖性更小，因此更容易预测 ON 的保留和洗脱顺序<sup>[7]</sup>。而与乙酸相比，HFIP 的真正优势在于能极大提高质谱的灵敏度。另一方面，HFIP 的缺点在于，高质量的 HFIP 试剂成本较高。要得到出色的质谱结果（即理

想的灵敏度和质谱图质量），甚至建议使用质量尽可能高的 HFIP，并且这些流动相要每日现配现用。考虑到要使用大量的 HFIP（配制 400 mmol/L 溶液需要约 7 g/100 mL），定期执行这些分析的实验室的消耗品成本明显增加。因此，探索含有低浓度 HFIP 的流动相组合是方法开发的一个重要部分，不仅可以优化分离，还可以降低每次分析的成本。

使用 UV 和 MS 进行了实验设置，用于评估胺和 HFIP 的不同组合。LC/UV 筛选实验中使用的流动相和梯度汇总于表 1。与之前的实验相反，甲醇梯度斜率在所有分析中保持一致。未尝试匹配 15 mmol/L TEA/400 mmol/L HFIP 参比条件的保留窗口。

表 1. 测试的胺-HFIP 组合与梯度

胺类 (15 mmol/L)	HFIP 浓度		
	25 mmol/L	100 mmol/L	400 mmol/L (= 参比)
三乙胺 (TEA)	25 mmol/L	100 mmol/L	400 mmol/L (= 参比)
丁胺 (BA)			
二丁胺 (DBA)*			
己胺 (HA)			
pH 缓冲液	9.45–9.55	8.60–8.70	7.85
所使用梯度**			
DNA 分子量标准品和样品 (3% B/min) 梯度	B 由 10% 升至 55% 15 min 内	B 由 10% 升至 70% 20 min 内	B 由 10% 升至 55% 15 min 内
NA 分离度标准品 (2% B/min) 梯度	B 由 5% 升至 35% 15 min 内	B 由 5% 升至 45% 20 min 内	B 由 5% 升至 35% 15 min 内

\* 胺类（尤其是 DBA）容易污染 LC 和 MS 离子源。可能需要更充分的清洗步骤将它们从系统中除去

\*\* 在每个梯度结束时，执行清洗步骤（90% B，2 分钟）和再平衡步骤（初始 %B，5 分钟）

缓冲液组成对 IPLC 保留的影响非常大。图 2 显示了使用测试的筛选组合获得的 DNA 分子量标准品的 LC/UV 分析结果。ON 的保留值总体上随 HFIP 浓度的降低而减小，随烷基胺链长度的增加而增大。RNA 分离度标准品和治疗性 ON 也得到类似的结果。从胺-乙酸盐流动相筛选中可以得出结论，研究胺-HFIP 流动相缓冲液组成能够有效地优化给定 ON 应用的条件。

基于这些筛选结果，使用 LC/UV/MS 对所选的流动相进行了评估。在默认条件（15 mmol/L TEA 和 400 mmol/L HFIP）和替代流动相下获得的 LC/MS 色谱图如图 3-6 所示。在给定的流动相组合下，所有分析样品的梯度起始条件和斜率保持不变。由于替代流动相提供了更强的保留性能，下一步则需要优化梯度，为给定样品提高分离度、缩短分析时间并提高灵敏度。本文不涉及这部分内容。

总体而言，与使用替代流动相相比，参考条件（15 mmol/L TEA/400 mmol/L HFIP）下的色谱分析并没有获得更出色的结果。使用替代流动相获得的保留性能整体上更出色（HFIP 浓度更低），这有利于提高分离度。对于 DNA 分子量标准品（图 3）和 RNA 分离度标准品（图 4），使用相同的梯度斜率作为参比和替代条件时获得的分离度基本不受影响。图 3 的原始质谱图表明，与三乙胺参比

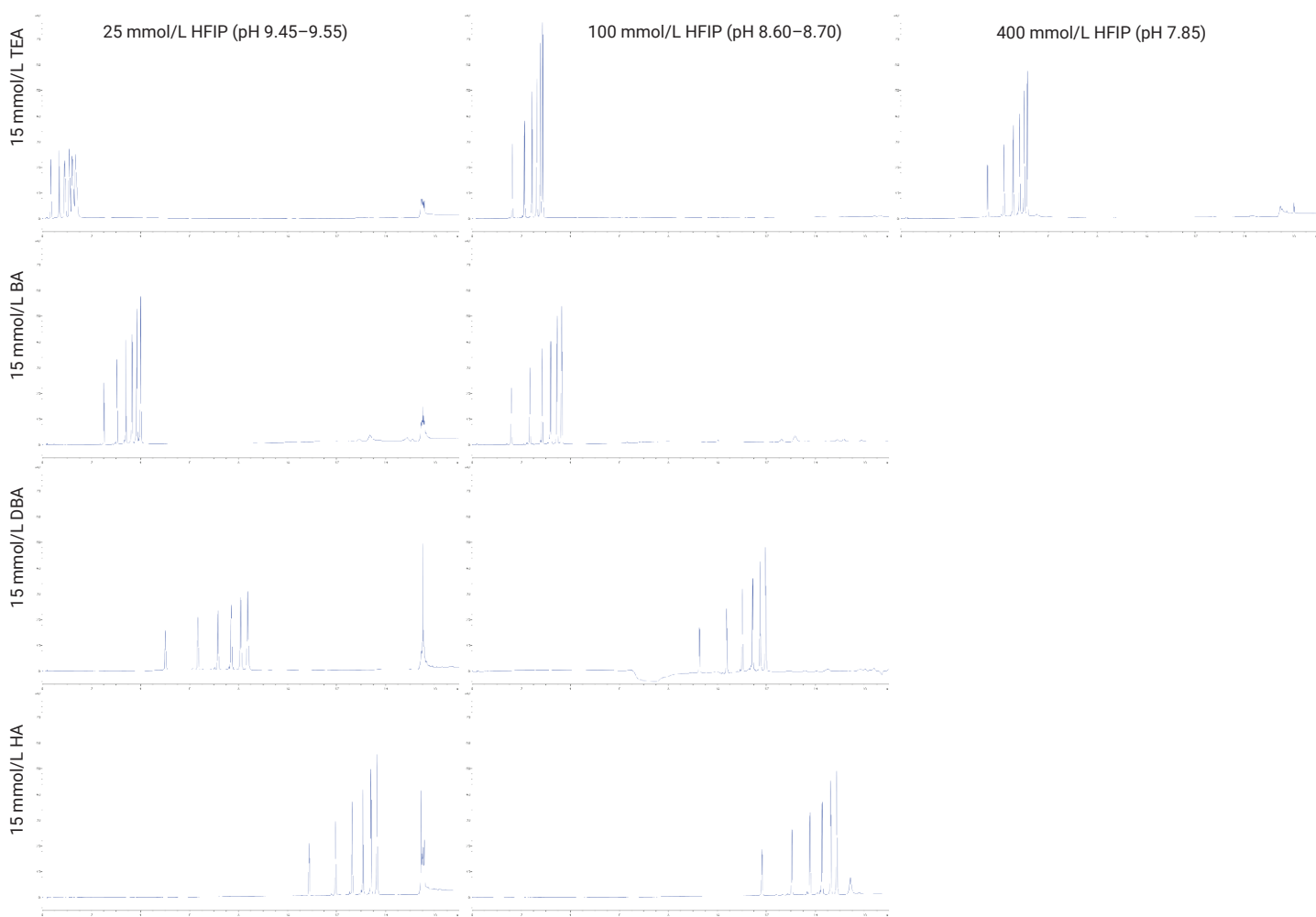


图 2. 在 260 nm 处使用 IPLC 的各种流动相添加剂对 DNA 分子量标准品进行 LC/UV 分析。流动相梯度：见表 1；其他方法参数：参见实验部分



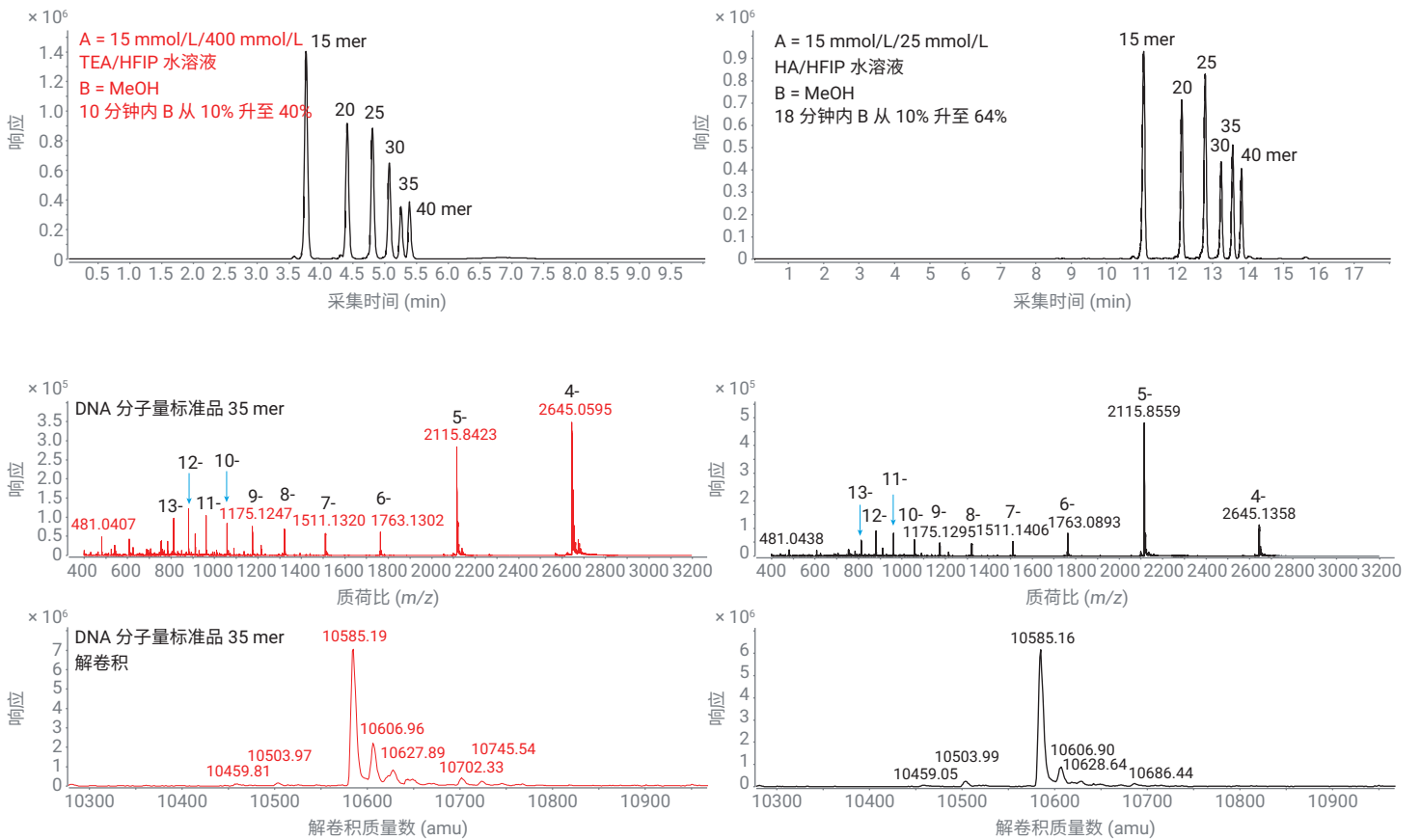


图 3. 使用 15 mmol/L TEA/400 mmol/L HFIP 参比条件 (左) 和 15 mmol/L HA/25 mmol/L HFIP 流动相 (右) 分析 DNA 分子量标准品得到的 LC/MS 结果。上: BPC; 中: 原始质谱图 35 mer; 下: 解卷积质谱图 35 mer。流动相梯度: 如图中所示; 其他方法参数: 参见实验部分

条件相比, 使用替代己胺流动相时, DNA 分子量标准品的电荷范围向电荷较高的物质转移, 并且加合物更少。在 RNA 分离度标准品分析中没有观察到电荷态的转

移, 此处使用流动相中包含二丁胺的替代条件同样获得了加合物更少的更清晰的谱图。在图 3 和图 4 底部的解卷积谱图中可以清楚地看出加合物形成的减少。

治疗性 ON 样品 A 显示出一个主峰, 此外有许多杂质峰在此主峰之前洗脱 (图 5)。这些峰可能由短链物质形成。使用替代条件时, 主峰与主峰尾部洗脱的杂质 (非长链物质) 之间的分离度增强。这意味着在仅需约 1/8 HFIP 的情况下提高了分离度。



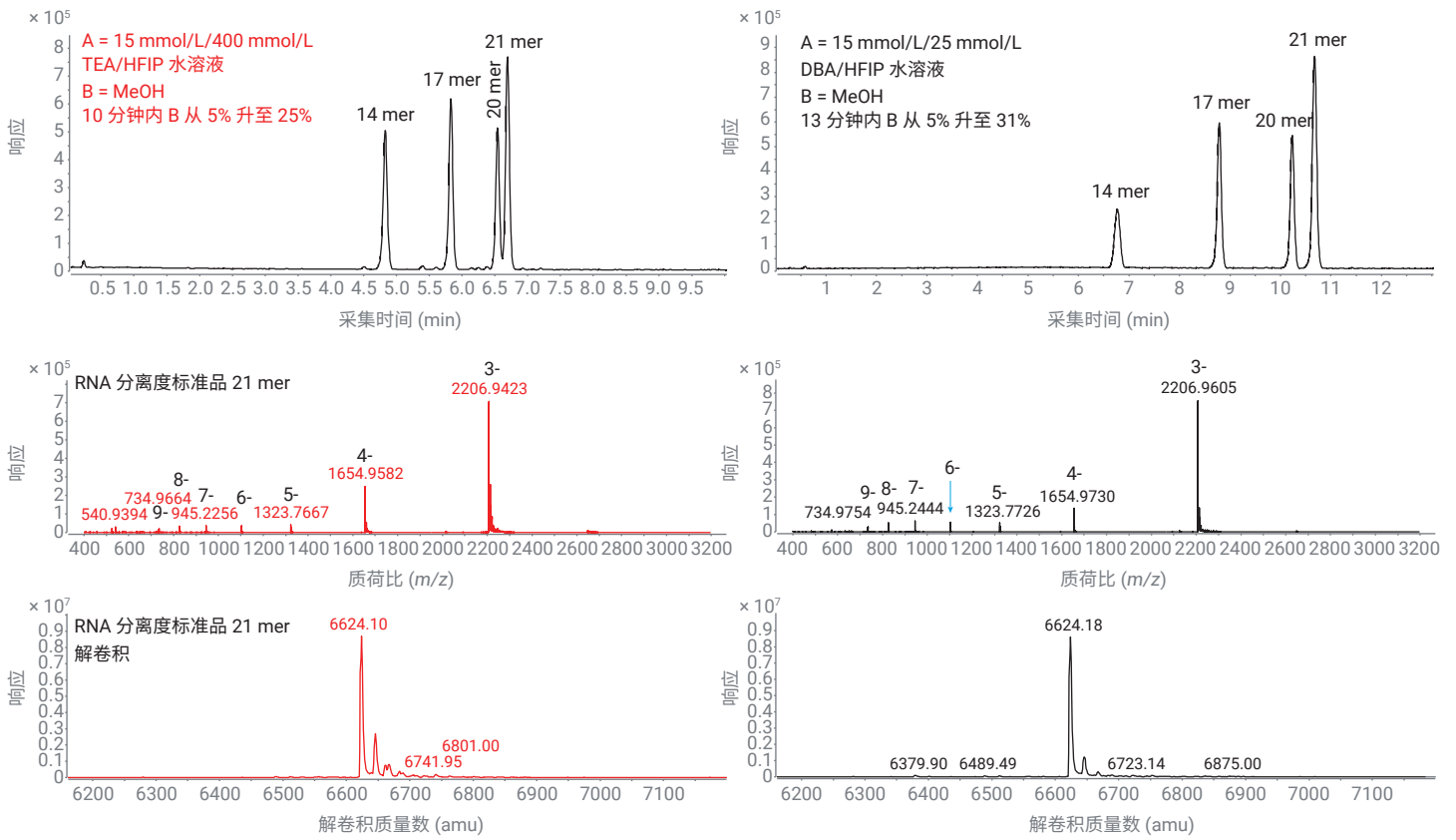


图 4. 使用 15 mmol/L TEA/400 mmol/L HFIP 参比条件 (左) 和 15 mmol/L DBA/25 mmol/L HFIP 流动相 (右) 分析 RNA 分离度标准品得到的 LC/MS 结果。上: BPC; 中: 原始质谱图 21 mer; 下: 解卷积质谱图 21 mer。流动相梯度: 如图中所示; 其他方法参数: 参见实验部分

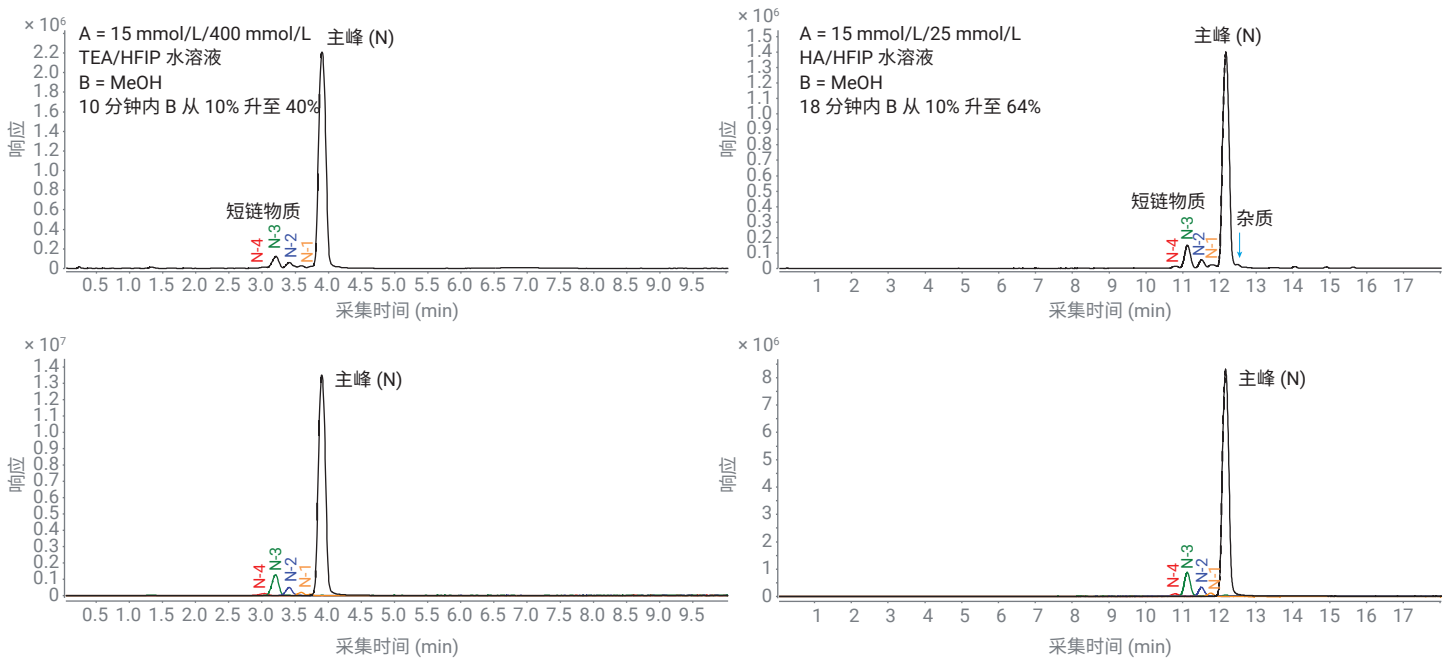


图 5. 使用 15 mmol/L TEA/400 mmol/L HFIP 参比条件 (左) 和 15 mmol/L HA/25 mmol/L HFIP 流动相 (右) 分析样品 A 得到的 LC/MS 结果。上: BPC; 下: EIC 主峰和短链物质。流动相梯度: 如图中所示; 其他方法参数: 参见实验部分

治疗性 ON 样品 B 的 LC/MS 数据如图 6 所示, 该样品是两种双链 siRNA 治疗药物 (13.5–15.0 kDa, 0.5  $\mu\text{mol/L}$ ) 的混合物, 由具有药理活性的 21 mer 和 22 mer 反义链 (as) 和经修饰的 21 mer 和 22 mer 正义链 (ss) 组成。注意, 在 65 °C 的操作条件下, 双链融化, 生成单链 (as)RNA 和 (ss)RNA。与默认条件 (15 mmol/L TEA 和 400 mmol/L HFIP) 相比, 使用替代流动相 (15 mmol/L HA 和 25 mmol/L HFIP) 时保留性能增强, 21 mer 和 22 mer (ss)RNA 之间的分离度显著提高。值得注意的是, 21 mer 和

22 mer (ss)RNA 与配体进行差异修饰以实现细胞摄取。这些色谱观察结果再次表明, 对于任何给定的 ON 样品类型, 可以并且应该根据其性质、复杂性和分析目标优化流动相和梯度条件。正如前面在 DNA 分子量标准品分析中所观察到的, 原始质谱图显示, 在使用替代条件时, 电荷范围向电荷较高的物质转移, 并且加合物更少。

质谱结果表明, 除了具有减少 HFIP 消耗的优势外, 替代流动相总体上还提供了更高质量的质谱结果。特别是与 TEA-HFIP 参考条件相比, 加合物的形成明显减少。

在 ON 的 IPLC/MS 分析中, 加合物的形成是一个众所周知的现象, 因为 ON 骨架中的磷酸二酯对流路中的盐具有亲和力。加合物 (主要为钠和钾) 的量受多种因素影响。流动相 (尤其是 HFIP) 的质量对是否存在加合物具有重大影响。因此, 建议流动相现配现用, 并且使用质量尽可能高的 HFIP。本研究使用的 HFIP 纯度  $\geq 99\%$ 。可以使用更高的纯度, 但成本也会相应增加 (约 5 倍)。流动相瓶、液相色谱系统和毛细管均应保持洁净。可能需要对液相色谱系统进行预处理或清洁, 以提高质谱图的质量并减少加合物。

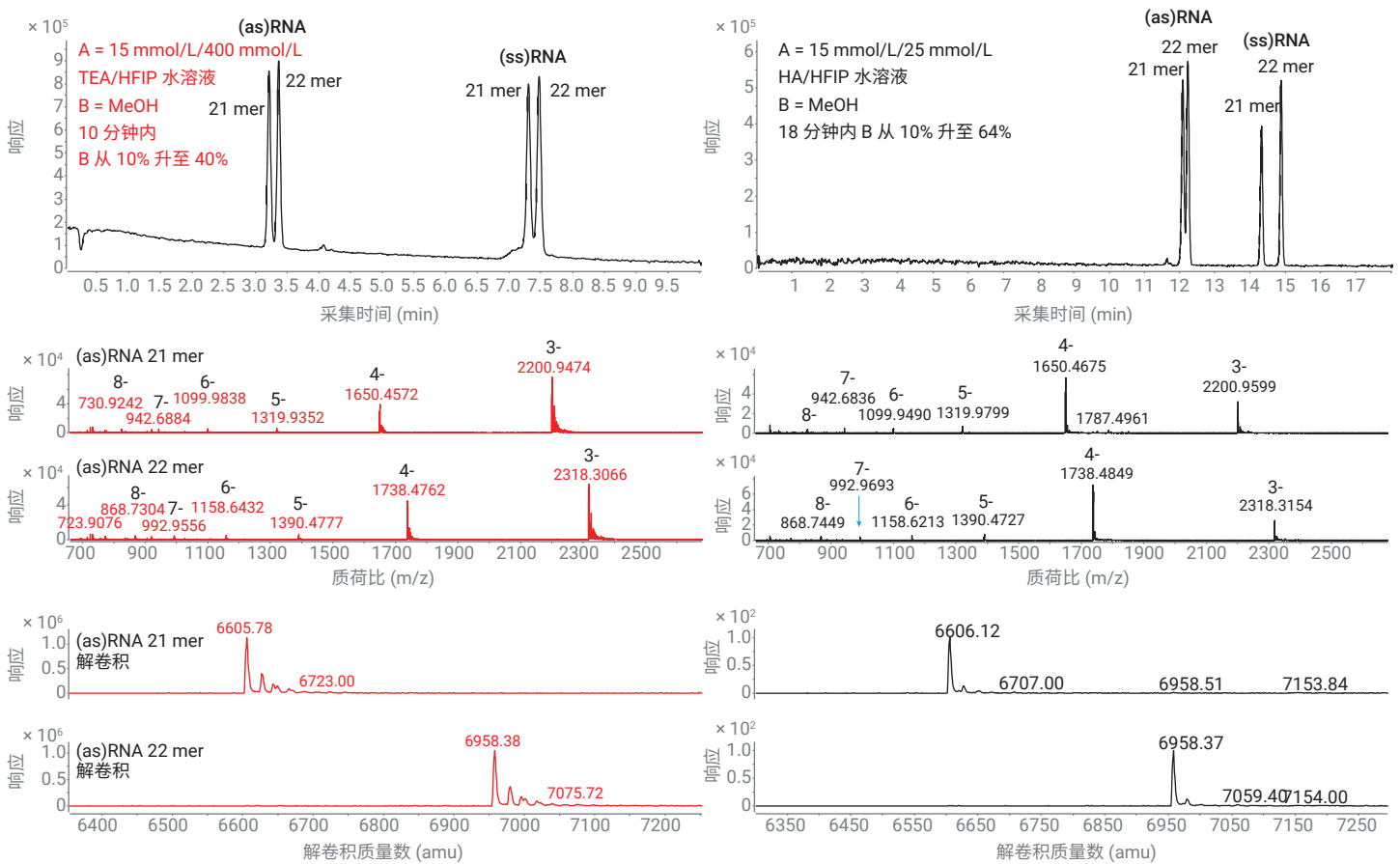


图 6. 使用 15 mmol/L TEA/400 mmol/L HFIP 参比条件 (左) 和 15 mmol/L HA/25 mmol/L HFIP 流动相 (右) 分析样品 B 得到的 LC/MS 结果。上: PBC; 中: 原始质谱图 (as)RNA 21 mer 和 22 mer; 下: 解卷积质谱图 (as)RNA 21 mer 和 22 mer。流动相梯度: 如图中所示; 其他方法参数: 参见实验部分

## 结论

结果表明,在各种 ON 的分析中,流动相的选择对色谱和质谱行为都具有重要作用。常规的流动相组成已证明其在一般 ON 分析中的价值,但实验表明可针对给定样品优化流动相组成。基于乙酸的流动相通常用于 LC/UV,主要由三乙胺和乙酸组成。本应用简报的数据表明,使用己胺和二丁胺等替代胺类通常是提高色谱分析质量的更好选择。对于 LC/MS 研究,基于 HFIP 的流动相是提高灵敏度的理想之选。同样,胺类的选择和 HFIP 的浓度对结果的影响非常大。HFIP 价格昂贵,因此降低流动相中 HFIP 的浓度的另一个好处就在于,可以降低 ON 的常规分析成本。

## 参考文献

1. Goyon, A.; Yehl, P.; Zhang, K. Characterization of Therapeutic Oligonucleotides by Liquid Chromatography. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2020**, *182*, 113105
2. Vanhinsbergh, C. J. Analytical Separation Methods for Therapeutic Oligonucleotides. LC-GC, Chromatography Online, *Advances in Biopharmaceutical Analysis (Special Issue)* **2020**, *33(10)*, 20–26
3. Li, Q. et al. Comprehensive Hydrophilic Interaction and Ion-Pair Reversed-Phase Liquid Chromatography for Analysis of Di- to Deca-Oligonucleotides. *J. Chromatogr. A* **2012**, *1255*, 237–243
4. Krieger, S.和 Dickhut, C, 无需手动纯化直接分析合成的寡核苷酸, *安捷伦科技公司应用简报*, 出版号 5991-9490ZHCN, **2018**
5. Apffel, A. et al. Analysis of Oligonucleotides by HPLC-Electrospray Ionization Mass Spectrometry. *Anal. Chem.* **1997**, *69*, 1320–1325
6. 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. *J. Chromatogr. A* **1997**, *777*, 3–21
7. Gilar, M. et al. Ion-Pair Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography Analysis of Oligonucleotides: Retention Prediction. *J. Chromatogr. A* **2002**, *958(1–2)*, 167–182
8. McGinnis, A. C.; Grubb, E. C.; Bartlett, M. G. Systematic Optimization of Ion-Pairing Agents and Hexafluoroisopropanol for Enhanced Electrospray Ionization Mass Spectrometry of Oligonucleotides. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2013**, *27(23)*, 2655–2664
9. 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 Commun. Mass Spectrom.* **2014**, *28(4)*, 339–350

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)

DE44180.3438773148

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，2021  
2021年1月4日，中国出版  
5994-2957ZH-CN

