

利用 LCMS 对寡核苷酸合成用亚磷酰胺单体原料进行定性分析

LCMS-052

摘要： 本文采用超高效液相色谱和单四极杆质谱 LCMS-2050 联用仪对寡核苷酸合成用亚磷酰胺单体原料进行定性分析。采用 DUIS (ESI+APCI) 离子源的正离子模式分析待测样品，通过优化色谱条件和质谱采集参数，使得亚磷酰胺单体色谱峰型良好并有较好的保留，且亚磷酰胺单体结构中磷原子处存在的两种非对映异构体均得到很好的分离。本方法适用于亚磷酰胺单体合成质控分析和原料进厂质控分析，可对其进行分子量确认。

关键词： LCMS 寡核苷酸 亚磷酰胺单体

技术特点：

- ❖ 通过优化色谱条件，实现亚磷酰胺两种非对映异构体良好分离。
- ❖ 本方法操作简便，可以进行高通量检测。

随着核酸药物研究的日益增长，将各种各样的寡核苷酸药物进行大规模生产将逐渐成为未来的趋势，其中化学合成法是合成短链寡聚核酸的主要方法。化学合成寡核苷酸的方法历经了半个多世纪的发展，其演变历程从最初的磷酸二酯法，到磷酸三酯法、氢磷酸法，再到目前比较成熟的亚磷酰胺法。

亚磷酰胺单体相互偶联，形成不断增长的寡核苷酸链。每次加入的亚磷酰胺原料所包含的杂质会在整个寡核苷酸的合成过程中累积，所以亚磷酰胺的品质

对于确保寡核苷酸化学合成的工艺稳定性至关重要。为了保证亚磷酰胺单体原料的品质，一般寡核苷酸药物企业会对原料进行进厂质控，确保原料主成分分子量准确。

本实验采用超高效液相色谱和单四极杆质谱 LCMS-2050 联用仪分别对 8 种不同的亚磷酰胺进行定性分析，操作简单、分析速度快，适用于亚磷酰胺单体合成质控分析和原料进厂质控分析，可对其进行分子量确认。

实验部分

1.1 仪器

Nexera XS Inert 生物惰性超高效液相色谱与单四极杆质谱 LCMS-2050 联用系统，具体配置信息如下：

系统控制器：	CBM-40	自动进样器：	SIL-40C XSi
脱气机：	DGU-405	柱温箱：	CTO-40C
输液泵：	LC-40D XSi×2	质谱仪：	LCMS-2050 单四极杆质谱仪
色谱工作站：	LabSolutions Ver. 5.114		



图 1 单四极杆液质联用仪 LCMS-2050

1.2 分析条件

色谱条件

色 谱 柱： Shim-pack GIST-HP C18-AQ (100 mm x 2.1 mm I.D., 1.9 μ m, 岛津 (上海) 实验器材有限公司, PN:227-30807-02)

流 动 相： A 相 -2 mM 甲酸铵水溶液, B 相 - 乙腈溶液

进 样 体 积： 1 μ L 柱 温： 40°C

流 速： 0.3 mL/min 洗 针 液： 甲醇 / 水 =1:1 (v:v)

洗 脱 方 式： 等度洗脱, B 相浓度为 77%

质谱条件

离 子 源： DUIS (ESI+APCI) 雾化气流速： 2.0 L/min

D L 温 度： 250°C 干燥气流速： 5.0 L/min

脱 溶 剂 温 度： 300°C 加 热 气 流 速： 7.0 L/min

扫 描 模 式： Scan (+) 扫 描 范 围： m/z 500~1500

1.3 样品前处理

1.3.1 亚磷酰胺样品信息

表 1 亚磷酰胺样品信息

序号	名称	简称	CAS
1	DMT-dA(Bz)-CE 亚磷酰胺	dA	98796-53-3
2	DMT-dG(dmf)-CE 亚磷酰胺	dG	330628-04-1
3	DMT-dC(Ac)-CE 亚磷酰胺	dC	154110-40-4
4	DMT-dT-CE 亚磷酰胺	dT	98796-51-1
5	DMT-2'-O-TBDMS-A(Bz)-CE 亚磷酰胺	A	104992-55-4
6	DMT-2'-O-TBDMS-G(iBu)-CE 亚磷酰胺	G	147201-04-5
7	DMT-2'-O-TBDMS-C(Ac)-CE 亚磷酰胺	C	121058-88-6
8	DMT-2'-O-TBDMS-U-CE 亚磷酰胺	U	118362-03-1

1.3.2 亚磷酰胺样品溶液配制

分别称量不同种类亚磷酰胺样品 1.0 mg, 用乙腈溶解, 并用乙腈逐级稀释成 50 μ g/mL 样品溶液上机分析。(亚磷酰胺特别容易由 P(III) 氧化为 P(V), 因此通常将其低温储存于惰性气体中, 并用无水乙腈制备, 现配现用, 以尽量减少与水的接触)

■ 结果与讨论

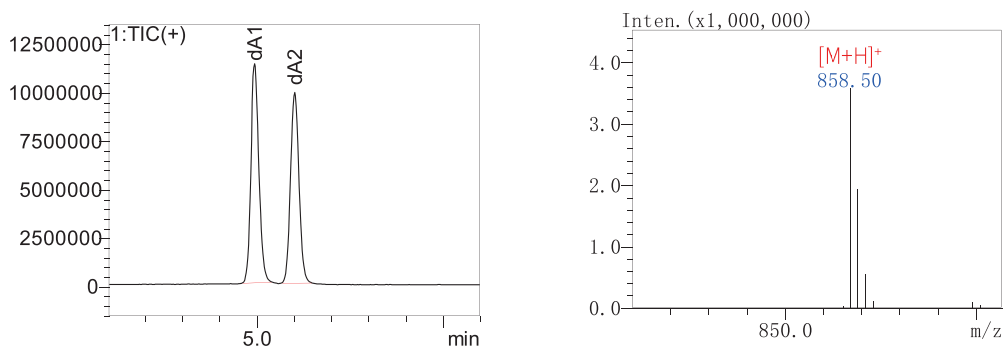
亚磷酰胺结构中磷原子处存在两种非对映异构体, 通过优化色谱条件, 使得各种亚磷酰胺的两种非对映异构体均得到很好的分离。

2.1 合成 DNA 用亚磷酰胺分子量及分析结果

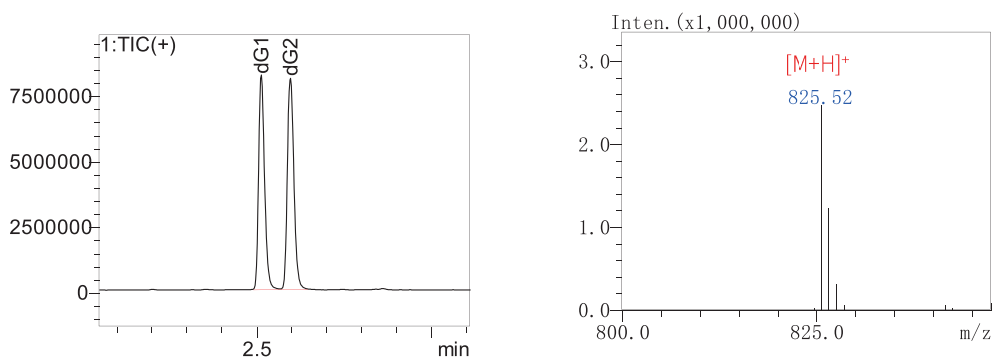
对合成 DNA 用亚磷酰胺 dA、dG、dC 和 dT 分别进行检测, 总离子流图和质谱图见图 1, 亚磷酰胺的分子式、理论分子量、实测分子量见表 2。其中 dA 检测到 m/z 858.5 峰、dG 检测到 m/z 825.5 峰、dC 检测到 m/z 772.5 峰均为 $[M+H]^+$ 峰。dT 检测到 m/z 745.4 $[M+H]^+$ 峰, m/z 767.4 $[M+Na]^+$ 峰和 m/z 783.4 $[M+K]^+$ 峰。

表 2 合成 DNA 用亚磷酸胺分子式及分子量检测结果

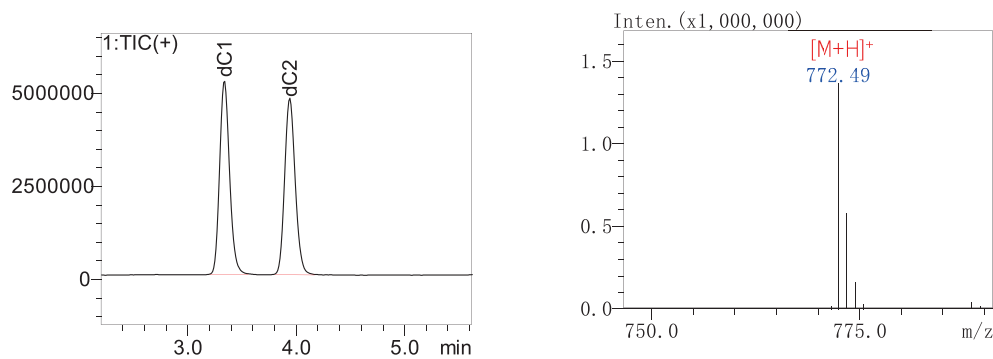
序号	名称	分子式	理论分子量	实测值
1	dA	C ₄₇ H ₅₂ N ₇ O ₇ P	857.4	858.5
2	dG	C ₄₃ H ₅₃ N ₈ O ₇ P	824.4	825.5
3	dC	C ₄₁ H ₅₀ N ₅ O ₈ P	771.3	772.5
4	dT	C ₄₀ H ₄₉ N ₄ O ₈ P	744.3	745.4



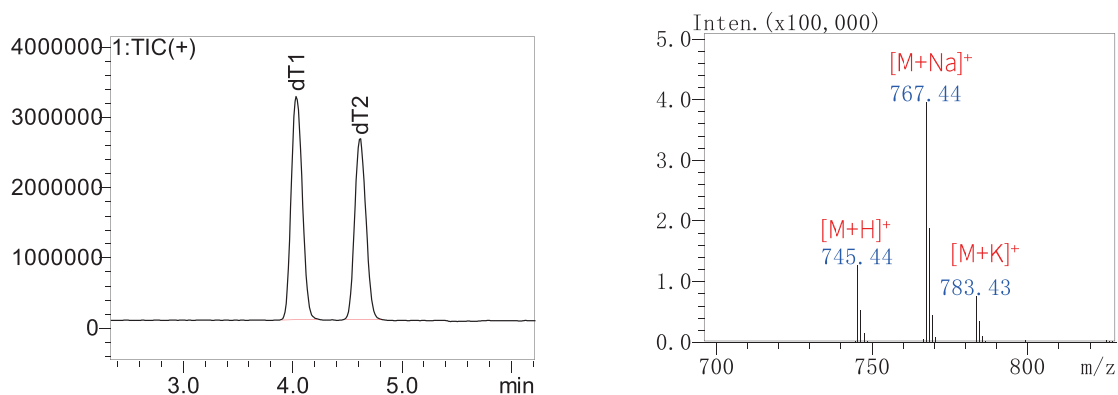
1a dA 总离子流色谱图和质谱图



1b dG 总离子流色谱图和质谱图



1c dC 总离子流色谱图和质谱图



1d dT 总离子流色谱图和质谱图

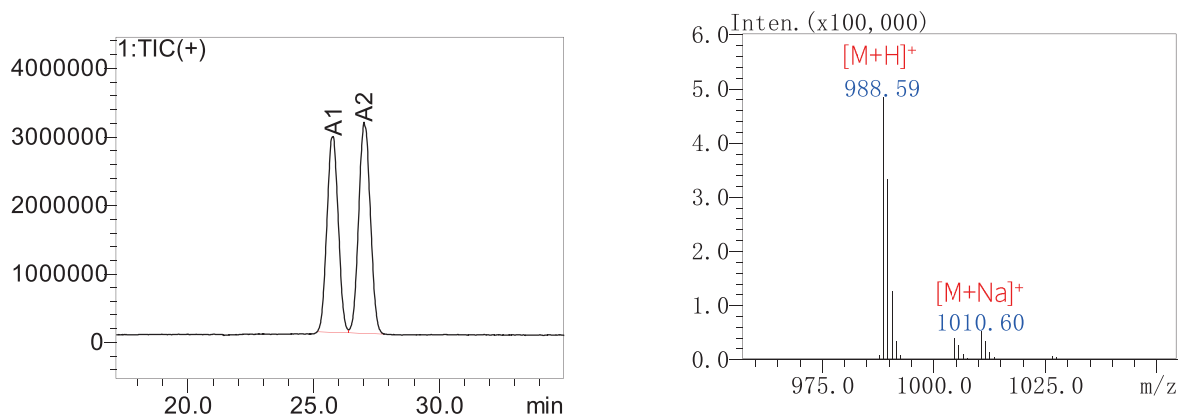
图1 合成 DNA 用亚磷酰胺总离子流色谱图和质谱图

2.2 合成 RNA 用亚磷酰胺分子量及分析结果

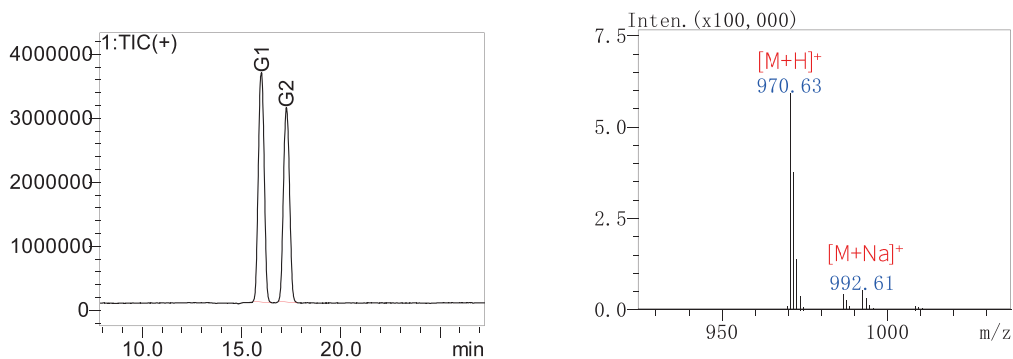
对合成 RNA 用亚磷酰胺 A、G、C 和 U 分别进行检测，总离子流图和质谱图见图 2，亚磷酰胺的分子式、理论分子量、实测分子量见表 3。其中 A 检测到 m/z 988.6 $[M+H]^+$ 峰和 m/z 1010.6 $[M+Na]^+$ 峰、G 检测到 m/z 970.6 $[M+H]^+$ 峰和 m/z 992.6 $[M+Na]^+$ 峰、C 检测到 m/z 902.6 $[M+H]^+$ 峰和 m/z 924.6 $[M+Na]^+$ 峰、U 检测到 m/z 861.5 $[M+H]^+$ 峰、 m/z 883.5 $[M+Na]^+$ 峰和 m/z 899.5 $[M+K]^+$ 峰。

表 3 合成 RNA 用亚磷酰胺分子式及分子量检测结果

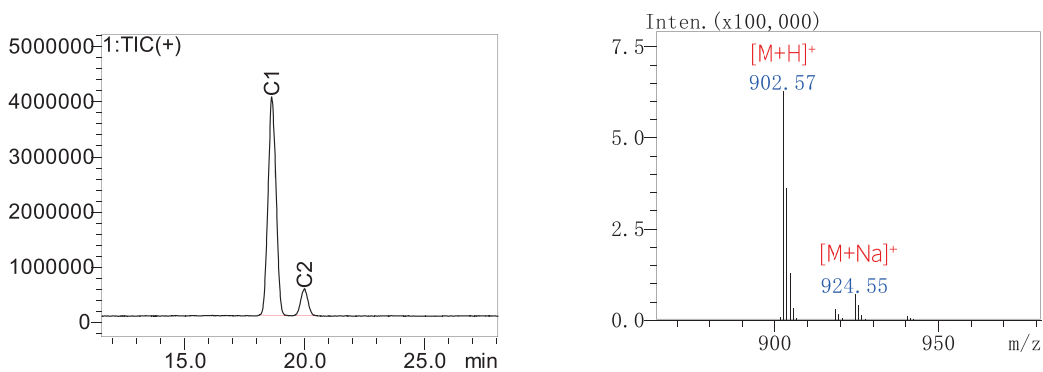
序号	名称	分子式	理论分子量	实测值
1	A	$C_{53}H_{66}N_7O_8PSi$	987.4	988.6
2	G	$C_{50}H_{68}N_7O_9PSi$	969.5	970.6
3	C	$C_{47}H_{64}N_5O_9PSi$	901.4	902.6
4	U	$C_{45}H_{61}N_4O_9PSi$	860.4	861.5



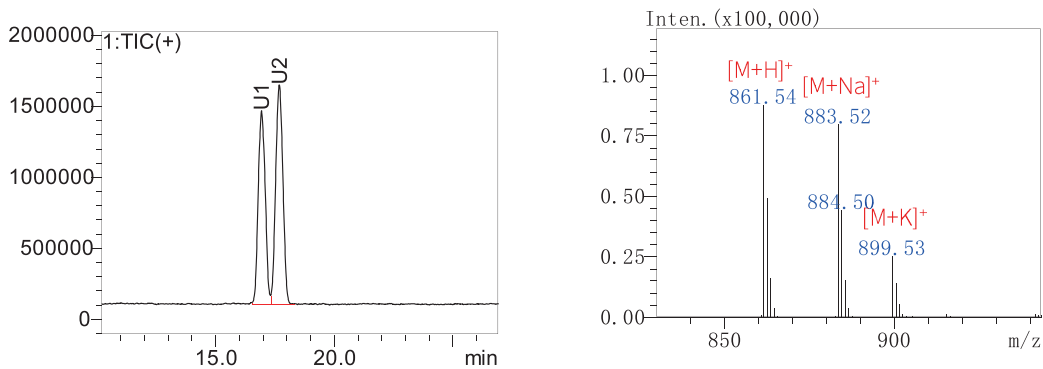
2a A 总离子流色谱图和质谱图



2b G 总离子流色谱图和质谱图



2c C 总离子流色谱图和质谱图



2d U 总离子流色谱图和质谱图

图2 合成RNA用亚磷酰胺总离子流色谱图和质谱图

结论

本文采用超高效液相色谱和单四极杆质谱 LCMS-2050 联用仪对寡核苷酸化学合成用亚磷酰胺原料进行定性分析，利用液相色谱进行分离，单四极杆质谱检测原料的分子量。该方法操作简单、分析速度快，亚磷酰胺单体结构中磷原子处存在的两种非对映异构体均得到很好的分离，结果可靠，适用于亚磷酰胺单体合成质控分析和原料进厂质控分析，可对其进行分子量确认。

岛津应用云

