

台式 MALDI-8030 快速分析寡核苷酸化学合成原料亚磷酰胺单体的分子量及杂质

MALDI-044

摘要：亚磷酰胺单体是寡核苷酸药物化学合成的关键物料，对亚磷酰胺单体进行分子量及杂质分析是寡核苷酸药物生产质量控制的重要内容。本文应用台式 MALDI-8030 分析了 16 种常见的亚磷酰胺单体，包括 8 种用于合成 DNA 的亚磷酰胺单体及 8 种用于合成 RNA 的亚磷酰胺单体，可以快速获得样品的精确分子量及杂质组成情况，为寡核苷酸药物化学合成物料的质量控制提供直接依据。

关键词： MALDI-TOF 亚磷酰胺单体 分子量 杂质

技术特点：

- ❖ 无需液相分离，分析速度快，最快 5-10 秒可分析一个样品，能够进行高通量检测。
- ❖ 图谱简单、直观，根据质谱图中信号峰质荷比的大小及组成可快速分析亚磷酰胺单体的分子量与杂质组成情况。

寡核苷酸药物的合成主要是在固相上进行的基于亚磷酰胺单体的四步化学合成法：脱保护、偶联、氧化和加帽。亚磷酰胺单体是寡核苷酸原料药的关键物料，符合质量要求的亚磷酰胺单体的供应是寡核苷酸药物商业化的关键因素。在实际应用中，亚磷酰胺单体会引入各种修饰以提高体内稳定性，但经过修饰后的分子结构变得复杂多样，杂质种类繁多，因此在

质量控制上具有极大的挑战。对亚磷酰胺单体的分子量及杂质进行分析是寡核苷酸药物物料质控的重要内容。本文应用台式 MALDI-TOF 质谱仪 MALDI-8030 对 16 种常用的亚磷酰胺单体的分子量及杂质进行了分析，该方法操作简单、分析速度快、结果直观，可作为亚磷酰胺单体日常快速质控的参考。

■ 实验部分

1.1 仪器

台式基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱仪 MALDI-8030

1.2 分析条件

调谐模式：	线性正离子模式	激光能量：	40
激光器：	355 nm 固态激光器	离子门阈值：	500
扫描范围：	m/z 500-5000	脉冲引出质量 (Da)：	1800

表 1 亚磷酰胺单体信息

序号	名称	简写	CAS	分子式	分子量 _{mono} (Da)
1	DMT-dA(Bz) 亚磷酰胺	DMT-dA	98796-53-3	C ₄₇ H ₅₂ N ₇ O ₇ P	857.37
2	DMT-dC(bz) 亚磷酰胺	DMT-dC	102212-98-6	C ₄₆ H ₅₂ N ₅ O ₈ P	833.36
3	DMT-dG(ib) 亚磷酰胺	DMT-dG	93183-15-4	C ₄₄ H ₅₄ N ₇ O ₈ P	839.38
4	DMT-dT 亚磷酰胺	DMT-dT	98796-51-1	C ₄₀ H ₄₉ N ₄ O ₈ P	744.33
5	DMT-2'-F-dA(Bz) 亚磷酰胺	fdA	136834-22-5	C ₄₇ H ₅₁ FN ₇ O ₇ P	875.36

6	DMT-2'-F-dC 亚磷酰胺	fdC	159414-99-0	C ₄₁ H ₄₉ FN ₅ O ₈ P	789.33
7	DMT-2'-F-dG(iBu) 亚磷酰胺	fdG	144089-97-4	C ₄₄ H ₅₃ FN ₇ O ₈ P	857.37
8	DMT-2'-F-dU 亚磷酰胺	fdU	146954-75-8	C ₃₉ H ₄₆ FN ₄ O ₈ P	748.30
9	DMT-2'-O-TBDMS-A(Bz) 亚磷酰胺	rA	104992-55-4	C ₅₃ H ₆₆ N ₇ O ₈ PSi	987.45
10	DMT-2'-O-TBDMS-C(Ac) 亚磷酰胺	rC	121058-88-6	C ₄₇ H ₆₄ N ₅ O ₉ PSi	901.42
11	DMT-2'-O-TBDMS-G(iBu) 亚磷酰胺	rG	147201-04-5	C ₅₀ H ₆₈ N ₇ O ₉ PSi	969.46
12	DMT-2'-O-TBDMS-U 亚磷酰胺	rU	118362-03-1	C ₄₅ H ₆₁ N ₄ O ₉ PSi	860.39
13	DMT-2'-OMe-Bz-A 亚磷酰胺	OMe-A	110782-31-5	C ₄₈ H ₅₄ N ₇ O ₈ P	887.38
14	DMT-2'-OMe-C(Ac) 亚磷酰胺	OMe-C	199593-09-4	C ₄₂ H ₅₂ N ₅ O ₉ P	801.35
15	DMT-2'-OMe-G(ibu) 亚磷酰胺	OMe-G	150780-67-9	C ₄₅ H ₅₆ N ₇ O ₉ P	869.39
16	DMT-2'-OMe-U 亚磷酰胺	OMe-U	110764-79-9	C ₄₀ H ₄₉ N ₄ O ₉ P	760.32

使用甲醇溶解以上样品，配制为 1 mg/mL 的样品工作液。取 0.5 μL NaTFA 溶液（1 mg/mL）、0.5 μL 样品工作液和 1 μL 葱三酚基质溶液（10 mg/mL）依次点靶，自然干燥后将靶板送入质谱分析。在质谱采集软件上选择待分析的样品靶点，可在几分钟内实现数十个样品的批量采集。最快 5-10 秒钟完成一个样品的质谱图采集。

■ 结果与讨论

16 种亚磷酰胺单体根据修饰类型的不同分为 4 组，质谱图见图 1- 图 4。图 1- 图 2 为用于合成 DNA 的 8 种常见亚磷酰胺单体，图 3- 图 4 为用于合成 RNA 的 8 种常见亚磷酰胺单体。除 fdU、DMT-dT、rU、OMe-U 外，其他 12 种亚磷酰胺单体均检测到样品的加氢峰、加钠峰和加钾峰等三种离子加合形式，实测分子量与理论分子量一致，以加钠峰为例，测试误差在 0.2 Da 以内。fdU、DMT-dT、rU、OMe-U 等 4 种亚磷酰胺单体检测到的离子加合峰为加钠峰、加钾峰两种，未检测到明显的加氢峰，这可能与化合物的性质有关。

各样品质谱图中主要的信号峰为亚磷酰胺单体的加合峰，但除此之外，每份亚磷酰胺单体均检测到少量杂质，杂质含量不等，样品亚磷酰胺单体和部分杂质的测试分子量信息见表 2。

表 2 16 种亚磷酰胺单体测试结果统计

序号	简写	分子式	[M+Na] ⁺ 理论	[M+Na] ⁺ 实测	杂质 (m/z)
1	DMT-dA	C ₄₇ H ₅₂ N ₇ O ₇ P	880.36	880.29	619.13、797.18、835.19、902.45 等
2	DMT-dC	C ₄₆ H ₅₂ N ₅ O ₈ P	856.35	856.23	878.36、811.10、616.13、641.21 等
3	DMT-dG	C ₄₄ H ₅₄ N ₇ O ₈ P	862.37	862.25	884.33、780.33、801.99、901.64 等
4	DMT-dT	C ₄₀ H ₄₉ N ₄ O ₈ P	767.32	767.26	684.18、692.29、722.28、805.40 等
5	fdA	C ₄₇ H ₅₁ FN ₇ O ₇ P	898.35	898.25	920.42、892.19、853.23、637.59 等
6	fdC	C ₄₁ H ₄₉ FN ₅ O ₈ P	812.32	812.21	914.43、729.06、967.52、612.12 等
7	fdG	C ₄₄ H ₅₃ FN ₇ O ₈ P	880.36	880.28	902.37、797.10、819.19、918.37 等
8	fdU	C ₃₉ H ₄₆ FN ₄ O ₈ P	771.29	771.17	793.23、929.19、809.23、687.95 等
9	rA	C ₅₃ H ₆₆ N ₇ O ₈ PSi	1010.44	1010.38	927.28、749.36、965.35、1032.77 等
10	rC	C ₄₇ H ₆₄ N ₅ O ₉ PSi	924.41	924.37	749.30、841.31、946.72、879.31 等
11	rG	C ₅₀ H ₆₈ N ₇ O ₉ PSi	992.45	992.42	1014.53、1030.52、906.42、1147.72 等
12	rU	C ₄₅ H ₆₁ N ₄ O ₉ PSi	883.38	883.32	838.28、905.51、749.30、921.55 等

13	OMe-A	C ₄₈ H ₅₄ N ₇ O ₈ P	910.37	910.22	888.18、932.39、649.12、865.10 等
14	OMe-C	C ₄₂ H ₅₂ N ₅ O ₉ P	824.34	824.34	649.24、741.26、779.22、846.46 等
15	OMe-G	C ₄₅ H ₅₆ N ₇ O ₉ P	892.38	892.42	809.26、930.41、994.48、692.20 等
16	OMe-U	C ₄₀ H ₄₉ N ₄ O ₉ P	783.31	783.26	700.11、821.34、738.23、692.14 等

备注：以上分子量为单同位素分子量

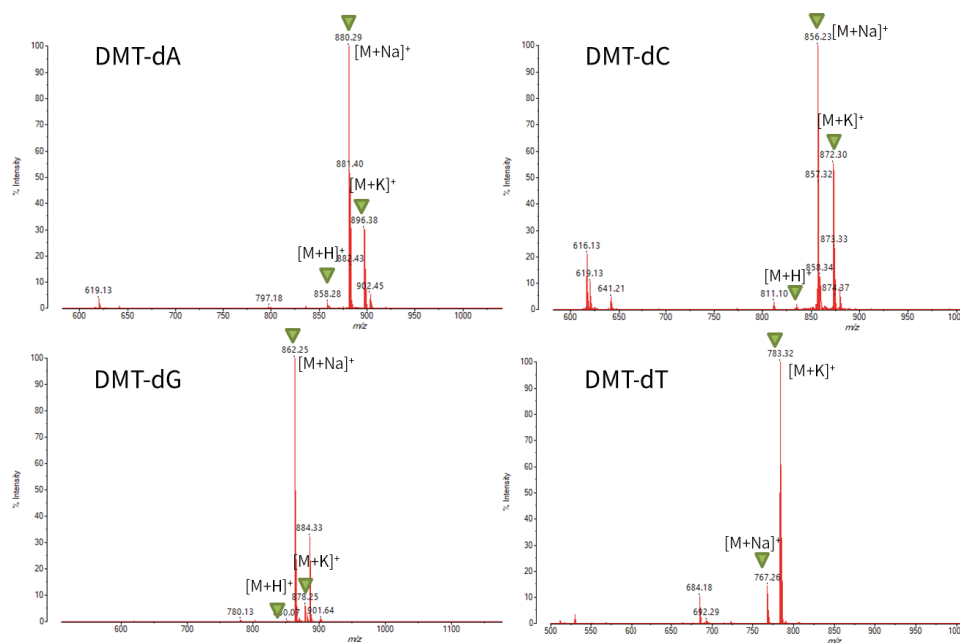


图 1 DMT-dA、DMT-dC、DMT-dG、DMT-dT 的质谱图

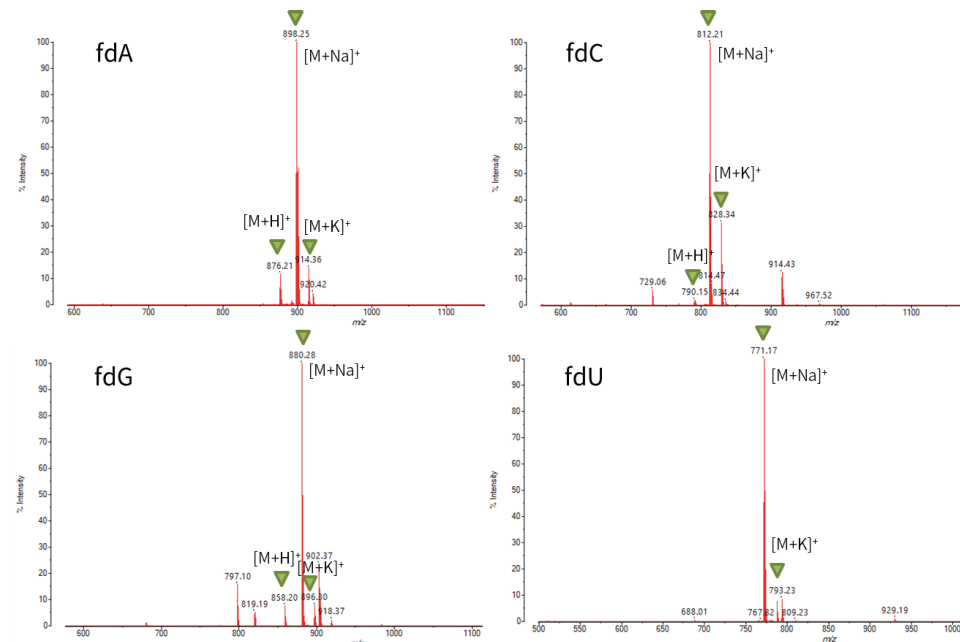


图 2 fdA、fdC、fdG、fdU 的质谱图

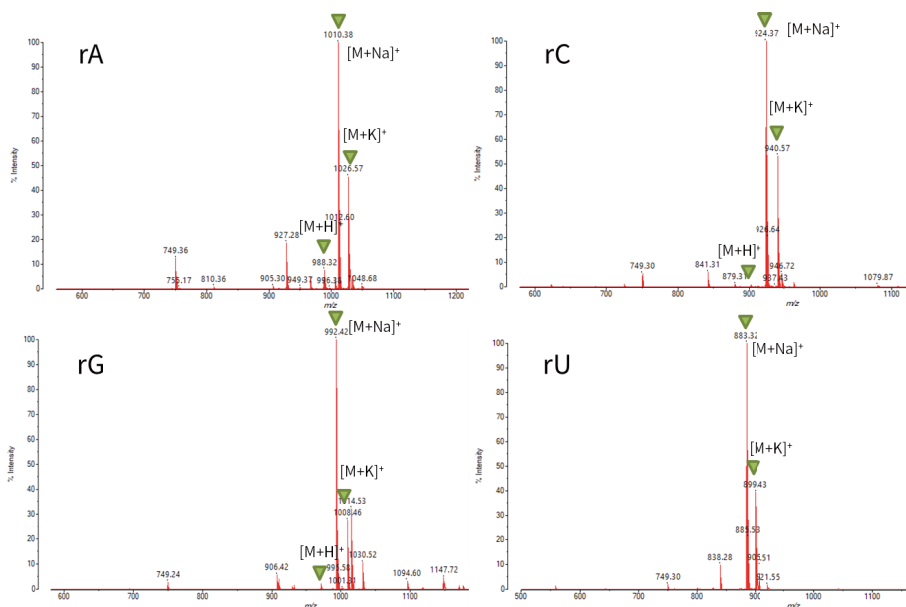


图3 rA、rC、rG、rU的质谱图

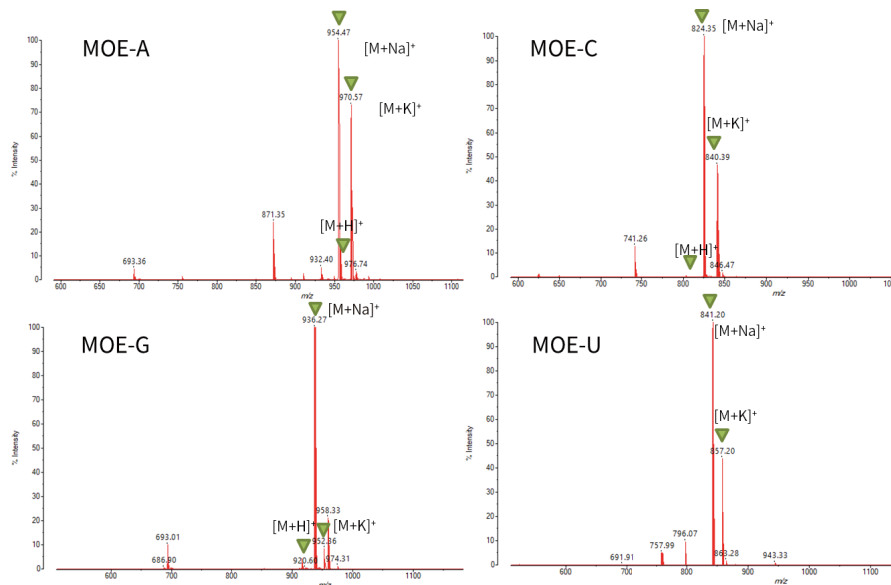


图4 MOE-A、MOE-C、MOE-G、MOE-U的质谱图

结论

本文应用台式基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱 MALDI-8030 对 16 种市售亚磷酰胺单体进行分子量及杂质检测，分析速度快，图谱简单直观，通过质谱图中信号峰的大小与分布可快速确认亚磷酰胺单体的精确分子量与杂质组成情况，为寡核苷酸化学合成物料质控提供直接依据。

岛津应用云

