

混合离子对试剂体系下寡核苷酸的 IP-RPLC 保留行为

乔俊琴, 梁超, 曹兆明, 练鸿振

(生命分析化学国家重点实验室, 南京大学化学化工学院和现代分析中心, 南京 210023)

摘要 利用离子对反相液相色谱(IP-RPLC)对寡核苷酸在混合离子对试剂三乙胺/丙胺-乙酸盐(TEA/PA-AA)体系下的保留行为进行了研究,并与经典离子对试剂三乙胺乙酸盐(TEAA)体系下的保留行为进行了对比.实验结果表明,相同离子对试剂浓度下,寡核苷酸在TEA/PA-AA体系下的保留均弱于TEAA体系下的保留,且寡核苷酸的保留均随着离子对试剂浓度(20~120 mmol/L)的增加而增强.同型寡核苷酸 $(dC)_n$ 作为特例,当 $n>10$ 时,保留基本趋于稳定,这是由于 $(dC)_n$ 随着离子对试剂浓度的增加保留增长较快,在较低的离子对试剂浓度下即可达到最大保留.同时发现,短链同型寡核苷酸 $(dT)_n$ 和异型寡核苷酸在TEA/PA-AA体系下的分离均优于TEAA体系,而同型寡核苷酸 $(dA)_n$ 和 $(dC)_n$ 的分离则在TEAA体系下更优.通过研究流动相中离子对试剂总浓度 c_p 与寡核苷酸保留因子 k 之间的关系,推断出2种体系下寡核苷酸的保留机理均以离子对模型占主导地位.总体而言,分离相同长度的异型寡核苷酸时,TEA/PA-AA混合离子对体系尤其在中等离子对浓度下比TEAA体系具有明显优势,低的离子对试剂浓度可增加与后续电喷雾质谱(ESI-MS)的兼容性,有利于寡核苷酸的定性分析.

关键词 离子对反相液相色谱(IP-RPLC);寡核苷酸;混合离子对试剂;保留行为;保留机理

中图分类号 O657 **文献标志码** A

离子对反相液相色谱(IR-RPLC)是核酸分离分析的标准平台,三乙胺乙酸盐(TEAA)由于具有高的分离效率成为首选的离子对试剂^[1-3],使用时在洗脱剂中加入乙腈后调节pH值为7.0.核酸的长度、碱基组成和碱基序列需用其它手段如电喷雾质谱(ESI-MS)测定,然而,TEAA用于液相色谱LC后续电喷雾质谱(ESI-MS)分析时,核酸的质谱信号强度较低^[4-6].这是由于三乙胺(TEA)的沸点(89℃)低于乙酸(AA,118℃),当TEAA用于ESI-MS分析时,TEA挥发较快,流动相中的AA会与核酸分子之间竞争离子化,从而抑制了核酸的离子化.而且,TEAA的疏水性小,流动相中需使用较低比例的有机调节剂,以便使液滴的表面势升高,进一步降低了离子化效率.此外,用于核酸IP-RPLC分离的典型TEAA浓度为100 mmol/L,高的离子对试剂浓度也是导致核酸质谱信号降低的因素之一.鉴于TEAA流动相在未知成分定性、鉴定方面受到很大限制,开发新的离子对试剂在保证核酸分离度的同时提高ESI-MS离子化效率具有重要意义.1995年,Bothner等^[7]尝试使用二异丙胺乙酸盐(DIEPA)和乙腈为流动相分离硫代磷酸酯和甲基磷酸酯寡核苷酸.1997年,Apffel等^[8]将六氟异丙醇(HFIP)和TEA作为LC-MS流动相添加剂,用于分析同型寡核苷酸 $(dT)_n$ 、pBR 322寡核苷酸片段和硫代磷酸酯反义寡核苷酸.HFIP/TEA-CH₃OH流动相既可对寡核苷酸进行有效分离,又能与ESI-MS兼容,质谱信号强度远高于TEAA,可用于核酸的定量分析^[9-13].1999年,Huber和Krajete^[4]在用LC-MS分析寡核苷酸时,引入离子对试剂三乙胺二碳酸盐(TEAB),通过加入乙腈为鞘流液,与相同浓度的TEAA相比,TEAB可使寡核苷酸的质谱信号增强7倍.此后,Huber等^[14]将TEAB替换为更加疏水的离子对试剂丁基二甲胺

收稿日期:2018-04-04.网络出版日期:2018-09-07.

基金项目:国家自然科学基金(批准号:21275069,21577057,91643105)、江苏省自然科学基金(批准号:BK20171335)和南京大学分析测试基金资助.

联系人简介:练鸿振,男,博士,教授,博士生导师,主要从事色谱分离和分析方面的研究.E-mail:hzlian@nju.edu.cn

二碳酸盐(BDMAB),采用较高比例的乙腈将寡核苷酸从 LC 固定相上洗脱下来,高的有机调节剂比例能够降低液滴的低表面势,致使寡核苷酸的质谱信号强度比 TEAB 体系下高了 10 倍^[15]. 2006 年, Oberacher 等^[16]在分析 23-prex PCR 时,采用环己基二甲基铵乙酸盐(CycHDMMA)作为离子对试剂,与丁基二甲胺(BDMAB)相比,环己基二甲基胺(CycHDMMA)与色谱柱具有更强的亲和性,故流动相中可以使用更高比例的乙腈,进一步提高了核酸的 ESI 离子化效率^[17]. 2009 年, McCarthy 等^[18]使用己胺乙酸盐(HAA)作为离子对试剂,利用 UPLC 在非变性条件下分离纯化单链和双链 RNA, HAA 比 HFIP 便宜且可用于 ESI-MS 检测,该方法快速、高效,在 siRNA 纯化方面具有很大进步. 2014 年, Gong 等^[19]采用 6 种不同的离子对试剂 TEA、三丙胺(TPA)、己胺(HA)、*N,N*-二甲基丁胺(DMBA)、二丁胺(DBA)和 *N,N*-二异丙基乙胺(DIPEA)分别与 HFIP 组合,通过对合成的寡核苷酸进行分析,评估了离子对试剂的分离效率. 结果表明,使用 HFIP/TPA, HFIP/DIPEA 和 HFIP/DBA 均可实现不同链长寡核苷酸的良好分离,在 50 mmol/L HFIP/15 mmol/L HA 体系下可获得最佳的分辨率. 在以上发展的离子对试剂中, TEA/HFIP-MeOH 对核酸的分离鉴定起到重要作用. 然而, TEA/HFIP-MeOH 的分辨率明显低于 TEAA-ACN, 迄今仅有少量分离双螺旋 DNA 和双链 siRNA 的报道^[20-22]. 2011 年, Levin 等^[23]在分析双链 siRNA 时发现,在流动相中采用不同离子对试剂的组合可以改善整体色谱峰的分辨率以及峰形,并且发展的混合离子对试剂可与 ESI-MS 兼容,由于所需混合离子对试剂浓度较低,质谱离子化效率高,提高了双链 siRNA 纯度分析以及相关杂质鉴定的准确性. 离子对试剂的种类是实现 IP-RPLC 良好分离的关键因素,然而有关混合离子对试剂在核酸分离分析中的应用研究还比较少,因此,对混合离子对试剂体系下核酸的保留行为进行研究将有利于核酸的分离、分析和鉴定.

本文采用三乙胺/丙胺-乙酸盐(TEA/PA-AA)为混合离子对试剂,分别对同型寡核苷酸和异型寡核苷酸的 IP-RPLC 保留行为进行了研究,并与经典离子对试剂 TEAA 下的保留进行对比. 尽管 IP-RPLC 的保留机理已有广泛研究,但由于反相离子对液相色谱模式的复杂性、核酸结构的柔韧性及多变性,至今核酸的 IP-RPLC 保留机理尚无定论^[24,25]. 离子对试剂的浓度在一定程度上能够反映吸附类型和分离机理^[26,27],因此,本文通过考察不同离子对试剂浓度下的保留行为,探索了寡核苷酸在 IP-RPLC 中的保留机理,并研究 2 种离子对试剂体系对不同性质寡核苷酸的保留影响特征.

1 实验部分

1.1 试剂与仪器

乙腈(HPLC 级)购自韩国霍尼韦尔公司;三乙胺和丙胺(HPLC 级)分别购自美国天地有限公司和上海百灵威科技有限公司;乙酸(纯度 $\geq 99.5\%$,分析纯)购自国药集团化学试剂有限公司. 实验用水均为超纯水(电阻率 18 M Ω ·cm),来自 Mill-Q Advantage A10 型超纯水仪(密理博中国有限公司). 17 种同型寡核苷酸(dA)₁₀, (dA)₂₀, (dA)₂₅, (dA)₃₀, (dT)₅, (dT)₇, (dT)₁₀, (dT)₁₂, (dC)₅, (dC)₆, (dC)₇, (dC)₈, (dC)₉, (dC)₁₀, (dC)₁₅, (dC)₂₀和(dC)₂₅及 8 种异型寡核苷酸(见表 1)均由上海生工生物技术有限公司合成. 所有寡核苷酸样品均用超纯水配制.

岛津 LC-20AD 型高效液相色谱仪(HPLC,日本岛津公司),包含真空脱气机、二元高压泵、自动进样器、柱温箱和双波长紫外检测器;FiveEasy Plus™ pH 计(瑞士梅特勒-托莱多国际贸易有限公司).

Table 1 Hetero-oligonucleotides used in the experiment

Oligonucleotide	Sequence (5'-3')	Percentage (%)				$\Delta G^*/(J \cdot mol^{-1})$
		G	C	A	T	
Oligo20-1	CTTAGTGAAGAGCTCAGTTA	25	15	30	30	-3.97×10^4
Oligo20-2	CTTAGTGAAGAGTCTCTAAG	25	15	30	30	-2.55×10^4
Oligo20-3	GACAGGAAAGACATTCTGGC	30	20	35	15	-1.48×10^4
Oligo20-4	GACAGGAAAGACATTCCGCT	30	20	35	15	-4.08×10^4
Oligo32-1	GTCGTTATCATCAGAGTAGCCAGGAAGCTTC	25	25	25	25	-5.60×10^4
Oligo32-2	GCGTACAGTATAGCCAGTCTTGAGTGCCATA	25	25	25	25	-1.53×10^4
Oligo32-3	GGTATGCTTACGAGTATGCTGAAGCGAGG	37.5	12.5	21.9	28.1	-1.95×10^4
Oligo32-4	CCTCGCTTCAGGCAATACTCGTAAACCATAACC	12.5	37.5	28.1	21.9	-1.95×10^4

* ΔG (Gibbs free energy) for oligonucleotides to form self-dimer was obtained from website of <http://www.idtdna.com/calc/analyzer>.

1.2 色谱条件

色谱柱为 Purospher[®]STAR RP-18 封端柱(150 mm×4.6 mm i.d., 5 μm), 柱温 30 °C, 流速 1.0 mL/min, 进样量 2 μL, 检测波长 260 nm, 流动相分别为 TEA/PA-AA 混合离子对试剂体系和 TEAA 单一离子对试剂体系, 进行相同的梯度洗脱: 0~40 min, 15%B~45%B; 40~43 min, 45%B~15%B; 43~58 min, 15%B~15%B. 保留时间采用两点校正法校正(RT-DPC)^[24,28].

TEA/PA-AA 体系: 流动相 A (TEA/PA-AA-5% CH₃CN, pH = 7.0); 流动相 B (TEA/PA-AA-25% CH₃CN, pH = 7.0); 流动相 A 和流动相 B 中离子对试剂的浓度相同, 且三乙胺和丙胺的体积比均为 1:1, 分别配制 6 个浓度梯度: 10 mmol/L TEA/10 mmol/L PA-20 mmol/L AA, 20 mmol/L TEA/20 mmol/L PA-40 mmol/L AA, 30 mmol/L TEA/30 mmol/L PA-60 mmol/L AA, 40 mmol/L TEA/40 mmol/L PA-80 mmol/L AA, 50 mmol/L TEA/50 mmol/L PA-100 mmol/L AA, 60 mmol/L TEA/60 mmol/L PA-120 mmol/L AA. 离子对试剂总浓度分别为 20, 40, 60, 80, 100 和 120 mmol/L.

TEAA 体系: 流动相 A (TEAA-5%CH₃CN, pH = 7.0); 流动相 B (TEAA-25%CH₃CN, pH = 7.0); 分别配制 6 个浓度梯度, 依次为 20, 40, 60, 80, 100 和 120 mmol/L TEAA.

2 结果与讨论

2.1 同型寡核苷酸的保留行为

2.1.1 同型寡核苷酸(dA)_n的保留行为 同型寡核苷酸(dA)_n在 10 mmol/L TEA/10 mmol/L PA 混合离子对体系下的色谱图如图 1 所示. 可见, 在 TEA/PA 体系下, (dA)_n均呈现良好的峰形, 保留顺序受尺寸控制^[25], 但(dA)₂₅和(dA)₃₀部分重叠; 而在 20 mmol/L TEA 体系下, 两者可实现完全的基线分离.

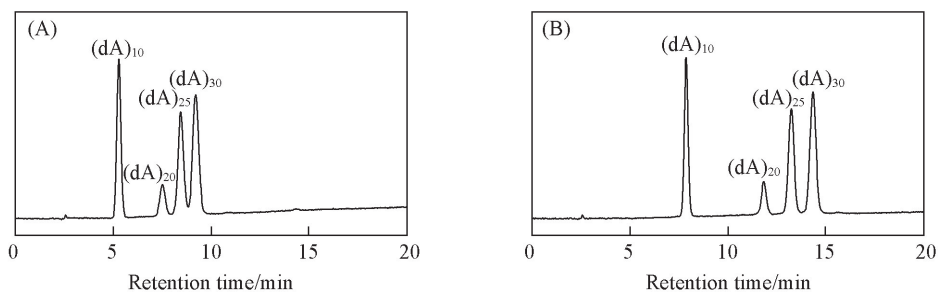


Fig.1 Chromatograms of (dA)_n under mobile phases containing either 10 mmol/L TEA/10 mmol/L PA (A) or 20 mmol/L TEA (B)

Purospher[®]STAR RP-18 endcapped column(50 mm×4.6 mm i.d., 5 μm); column temperature: 30 °C; mobile phase A (10 mmol/L TEA/10 mmol/L PA-20 mmol/L AA-5%CH₃CN, pH = 7.0) or (20 mmol/L TEAA-5%CH₃CN, pH = 7.0), mobile phase B (10 mmol/L TEA/10 mmol/L PA-20 mmol/L AA-25%CH₃CN, pH = 7.0) or (20 mmol/L TEAA-25%CH₃CN, pH = 7.0); gradient elution: 0—40 min, 15%B—45%B; 40—43 min, 45%B—15%B; 43—58 min, 15%B—15%B; flow rate: 1.0 mL/min; detection wavelength: 260 nm.

保持其它色谱条件不变, 改变流动相中离子对试剂的浓度, 2 种体系下(dA)_n的保留均随离子对试剂浓度的增加而增强, 高离子对试剂浓度下保留增长相对较缓(见图 2). 相同离子对试剂浓度下, (dA)_n在 TEA/PA 体系下的保留均弱于 TEA 体系下的保留. 2 种体系下, (dA)_n中相邻 2 个色谱峰之间的分离度(*R_s*)如表 2 所示. 可见, 在相同离子对试剂浓度下, (dA)_n在 TEA 体系下的分离明显优于 TEA/PA 体系. 最大分离度出现在 A10/A20 之间, 随着碱基数目的增加, 分离度逐渐下降, 这与文献[29]结果一致. 2 种体系下, A10/A20, A20/A25 和 A25/A30 之间的分离度均随着离子对试剂浓度(20~100 mmol/L)的增加而增大, 说明长链(dA)_n的保留随着离子对试剂浓度的增长程度大于短链(dA)_n.

2.1.2 同型寡核苷酸(dT)_n的保留行为 在 TEA/PA 和 TEA 体系下, (dT)₅, (dT)₇, (dT)₁₀和(dT)₁₂的色谱峰峰形均较尖锐, 且各峰之间能够实现良好分离. 2 种体系下, 随着离子对试剂浓度的增加, (dT)_n均呈现保留上升的现象, 但在 TEA/PA 体系中保留上升的程度大于 TEA 体系(图 3). 在相同离子对试剂浓度下, (dT)_n在 TEA/PA 体系下的保留均弱于 TEA 体系. 同样, 比较了不同离子对试剂浓

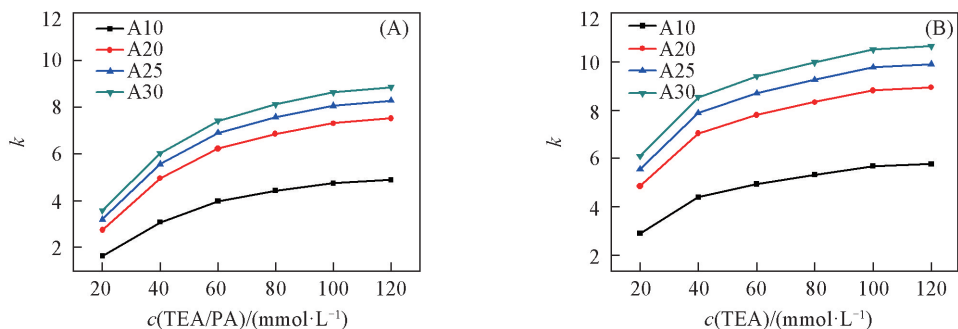


Fig.2 Retention factor k of $(dA)_n$ under mobile phases containing different concentrations of ion-pair reagent

(A) TEA/PA; (B) TEA. The concentrations of ion-pair reagent in mobile phase were 20, 40, 60, 80, 100 and 120 mmol/L, respectively. Other chromatographic conditions were the same as in Fig.1.

Table 2 Resolution (R_s) of adjacent peaks in $(dA)_n$ under different concentrations of ion-pair reagent

$c_p^*/(\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1})$	TEA/PA			TEA		
	A10/A20	A20/A25	A25/A30	A10/A20	A20/A25	A25/A30
20	5.02	1.76	1.34	9.06	2.73	1.97
40	9.20	2.66	1.89	12.47	3.47	2.55
60	10.90	2.96	2.12	13.36	3.74	2.77
80	11.58	3.17	2.29	13.98	3.92	2.89
100	12.37	3.33	2.37	14.76	4.03	2.96
120	12.55	3.34	2.39	14.42	3.99	2.94

* c_p is the total concentration of ion-pair reagents.

度下 $(dT)_n$ 相邻 2 个色谱峰之间的分离情况, 分离度如表 3 所示. 与同型寡核苷酸 $(dA)_n$ 相同, 两相邻峰的最大分离出现在短链 (T5/T7) 之间, 随着碱基数目的增加, 分离度逐渐下降. 离子对试剂浓度在 20~120 mmol/L 区间时, T5/T7, T7/T10 和 T10/T12 之间的分离度均随着离子对试剂浓度的增加而增大. 与 $(dA)_n$ 不同, 除 T10/T12 之外, $(dT)_n$ 在 TEA/PA 混合离子对体系下的分离度明显优于 TEA 单一离子对体系. 可见, TEA/PA 有利于分离短链 $(dT)_n$ ($n \leq 10$).

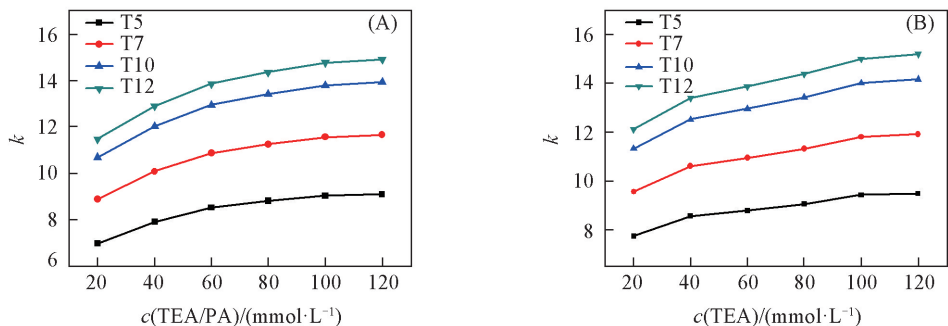


Fig.3 Retention factor k of $(dT)_n$ under mobile phases containing different concentrations of ion-pair reagent

(A) TEA/PA; (B) TEA. The chromatographic conditions are the same as those in Fig.2.

Table 3 Resolution (R_s) of adjacent peaks in $(dT)_n$ under different concentrations of ion-pair reagent

$c_p/(\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1})$	TEA/PA			TEA		
	T5/T7	T7/T10	T10/T12	T5/T7	T7/T10	T10/T12
20	10.28	9.24	3.78	9.79	9.26	4.08
40	11.79	10.42	4.44	10.96	10.20	4.53
60	12.50	10.96	4.76	11.58	10.48	4.85
80	12.92	11.32	4.85	11.83	10.98	5.06
100	13.32	11.63	5.06	12.24	11.40	5.07
120	13.49	11.78	5.31	12.54	11.60	5.26

2.1.3 同型寡核苷酸 $(dC)_n$ 的保留行为 在 TEA/PA 和 TEA 体系下, $(dC)_{10}$ 和 $(dC)_{15}$ 的色谱峰峰形尖锐, 但 $(dC)_{20}$ 和 $(dC)_{25}$ 均呈现峰形展宽, 推测在长链 $(dC)_n$ 中可能存在着分子内氢键作用. 在相同离子

对试剂浓度下, $(dC)_n$ 在 TEA/PA 体系下的保留仍然弱于在 TEA 体系下的保留 (见图 4), 但在 20~120 mmol/L 离子对试剂浓度下, $(dC)_n$ 与 $(dA)_n$ 和 $(dT)_n$ 的保留趋势截然不同. 在 TEA/PA 体系下, $(dC)_{10}$ 的保留随着离子对试剂浓度的增加呈现上升趋势; 而 $(dC)_{15}$, $(dC)_{20}$ 和 $(dC)_{25}$ 在离子对试剂浓度为 20 mmol/L 时保留最强, 在 40 mmol/L 时保留下降, 然后随着离子对试剂浓度的进一步增高保留又缓慢增强, 在 80~120 mmol/L 时相对稳定, 但总体而言, $(dC)_{15} \sim (dC)_{25}$ 在离子对试剂浓度为 20~120 mmol/L 范围内的保留整体变化不大 [图 4(A)]. 在 TEA 体系下, $(dC)_{10} \sim (dC)_{25}$ 的保留在离子对试剂浓度为 20~40 mmol/L 范围内均呈缓慢上升趋势, 其中 $(dC)_{10}$ 的变化趋势较明显; 在 40~100 mmol/L 范围内保留相对稳定, 在 100~120 mmol/L 范围内保留出现下降 [图 4(B)]. 通常情况下, 相同色谱条件下碱基保留顺序为 $C < A$ [30,31]. 通过对比图 2 和图 4 可发现, 在 20~100 mmol/L TEA/PA 体系下, $(dC)_{20}$ 的保留均大于 $(dA)_{20}$, 而在 20~120 mmol/L TEA/PA 体系下, $(dC)_{25}$ 的保留均大于 $(dA)_{25}$. 在 TEA 体系下发现了类似的现象: 在 20~60 mmol/L 范围内 $(dC)_{20} > (dA)_{20}$; 20~100 mmol/L 范围内 $(dC)_{25} > (dA)_{25}$. 以上保留现象无法用常规理论解释, 因此进一步对链长小于 10 的 $(dC)_n$: $(dC)_5$, $(dC)_6$, $(dC)_7$, $(dC)_8$ 和 $(dC)_9$ 在相同色谱条件下进行了保留行为考察, 结果如图 4(C) 和 (D) 所示. 可见, 在 TEA/PA 体系下, $(dC)_5 \sim (dC)_9$ 的保留呈现出与 $(dA)_n$ 和 $(dT)_n$ 相似的保留趋势, 即保留随着离子对试剂浓度的增加而增强. 在 TEA 体系下, $(dC)_5 \sim (dC)_9$ 的保留在离子对试剂浓度为 20~60 mmol/L 范围内快速上升, 在 60~100 mmol/L 范围内保留出现平台, 在 100~120 mmol/L 范围内保留下降. 基于以上发现, 推测 $(dC)_n$ 随着离子对试剂浓度的增大保留会迅速上升, 与 $(dA)_n$ 相比, $(dC)_n$ 在较低的离子对试剂浓度下即可达到最大保留并在一定范围内维持稳定, 且 $(dC)_n$ 链越长保留最大值出现得越早. 我们推测 $(dC)_n$ 更容易与离子对试剂发生相互作用. 此外, 由图 4(C) 和 (D) 可见, 当离子对试剂总浓度相同时, $(dC)_n$ 在 TEA/PA 体系下达到保留稳定的状态要晚于 TEA 体系.

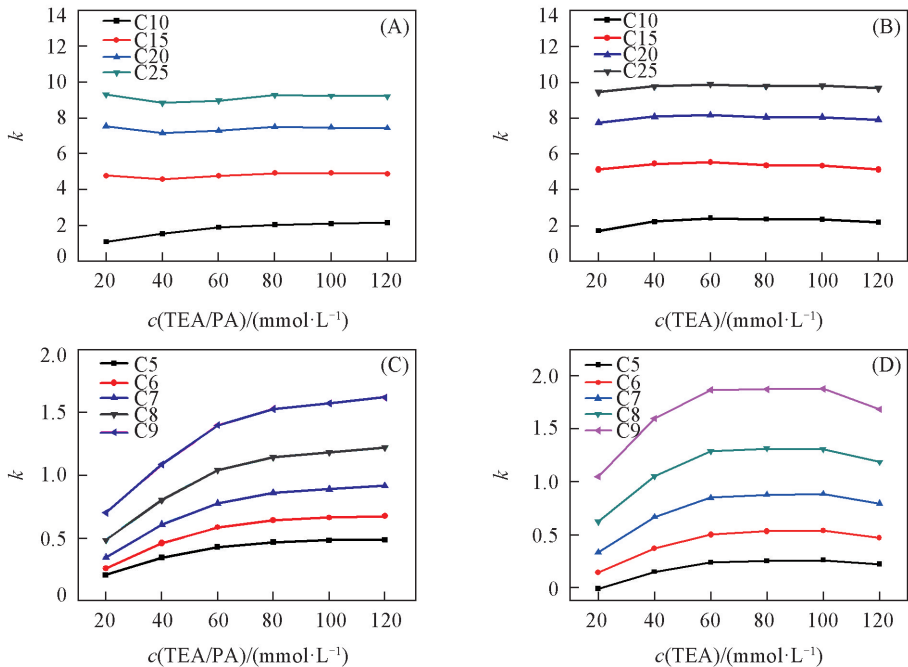


Fig.4 Retention factor (k) of $(dC)_n$ under mobile phases containing different concentrations of ion-pair reagent

(A), (C) TEA/PA; (B), (D) TEA. The chromatographic conditions are the same as those in Fig.2.

2 种体系下, $(dC)_n$ 相邻 2 个色谱峰之间的分离度如表 4 所示. 结果表明, 在 TEA/PA 体系下, C5/C6, C6/C7, C7/C8 和 C8/C9 的分离度均随着离子对试剂浓度的增加而增大, C10/C15 的分离度表现为先上升后下降, 而 C15/C20 和 C20/C25 的分离度受离子对试剂浓度的影响不大. 在 TEA 体系下, 随着离子对试剂浓度的增加, C5/C6, C6/C7, C7/C8 和 C8/C9 的分离度均表现为先上升后下降的趋势, C10/C15 的分离度逐渐下降, C15/C20 和 C20/C25 的分离度变化不大. 整体上, $(dC)_n$ 在 TEA 体系中的分离度高于 TEA/PA 体系.

Table 4 Resolution (Rs) of adjacent peaks in $(dC)_n$ under different concentrations of ion-pair reagent

System	$c_p / (\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1})$	C5/C6	C6/C7	C7/C8	C8/C9	C10/C15	C15/C20	C20/C25
TEA/PA	20	0.43	0.76	1.15	1.53	12.90	5.24	1.88
	40	1.21	1.33	1.38	1.68	12.03	5.44	2.09
	60	1.54	1.58	1.80	2.02	11.46	5.37	2.01
	80	1.67	1.81	1.91	2.12	11.37	5.47	1.93
	100	1.72	1.86	1.94	2.10	11.43	5.09	2.06
	120	1.79	1.95	2.02	2.16	10.94	5.45	2.15
TEA	20	1.16	1.25	1.67	2.00	13.01	5.57	2.00
	40	1.69	1.86	1.98	2.35	13.46	5.53	1.94
	60	1.82	1.98	2.12	2.46	13.05	5.51	1.97
	80	1.91	1.98	2.16	2.41	12.48	5.62	1.99
	100	1.86	1.93	2.07	2.29	12.36	5.31	2.01
	120	1.73	1.90	1.96	2.15	12.04	5.71	2.04

2.2 异型寡核苷酸的保留行为

2.2.1 20mer 异型寡核苷酸的保留行为 在所选取的 4 条 20mer 异型寡核苷酸中, oligo 20-1 和 oligo 20-2 的碱基组成相同、序列不同, oligo 20-3 和 oligo 20-4 的碱基组成相同、序列不同(见表 1). 在 2 种体系下, 4 种寡核苷酸的保留均随着离子对试剂浓度的增加而增强, 保留顺序为 oligo 20-1>oligo 20-2>oligo 20-3>oligo 20-4(见图 5). 其中, oligo 20-1 和 oligo 20-2 的保留随着离子对试剂浓度的增加逐渐靠近, 当 TEA/PA 浓度 ≥ 100 mmol/L 时, 两者之间的保留顺序交换. 与同型寡核苷酸一致, 在相同离子对试剂浓度下, TEA/PA 体系下的保留均弱于 TEA 体系. 20mer 异型寡核苷酸按照出峰顺序在不同离子对试剂浓度下的分离度列于表 5. 结果表明, oligo 20-3/20-4 的分离度明显优于 oligo 20-1/20-2. 这是由于与 oligo 20-3 相比 oligo 20-4 存在着分子内氢键, 具有较大的立体位阻, 因而 oligo 20-4 的保留较弱. Oligo 20-1 和 oligo 20-2 均具有分子内氢键, 两者在结构上相差不大, 因而保留接近. 在 2 种体系下, oligo 20-4/20-3 和 oligo 20-3/20-2 的分离度均随着离子对试剂浓度的增加而增大, 而 oligo 20-2/20-1 的分离度则随着离子对试剂浓度的增大而下降. 整体而言, TEA/PA 体系对于 4 条 20mer 异型寡核苷酸的分离优于 TEA 体系.

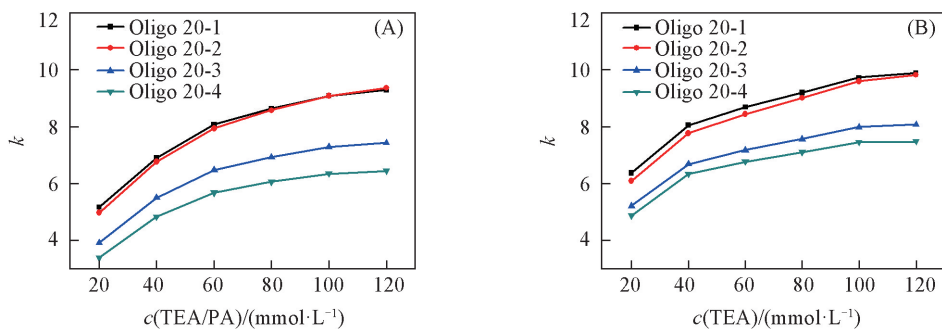


Fig.5 Retention factor (k) of 20mer hetero-oligonucleotides under mobile phases containing different concentrations of ion-pair reagent

(A) TEA/PA; (B) TEA. The chromatographic conditions are the same as those in Fig.2.

Table 5 Resolution (Rs) of adjacent peaks in 20mer hetero-oligonucleotides under different concentrations of ion-pair reagent

$c_p / (\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1})$	TEA/PA			TEA		
	20-4/20-3	20-3/20-2	20-2/20-1	20-4/20-3	20-3/20-2	20-2/20-1
20	2.18	4.41	0.87	1.50	3.90	1.29
40	3.34	6.29	0.61	1.61	5.00	1.32
60	3.73	6.88	0.61	1.88	5.88	1.15
80	4.01	7.59	0.28	2.12	6.65	0.84
100	4.39	8.52 ^a	0.02 ^b	2.42	7.29	0.60
120	4.53	8.74 ^a	0.34 ^b	2.65	7.84	0.28

a. Resolution between oligo 20-3/20-1; b. resolution between oligo 20-1/20-2.

2.2.2 32mer 异型寡核苷酸的保留行为 在所选取的 4 条 32mer 异型寡核苷酸中, oligo 32-1 和 oligo 32-2 的碱基组成相同、序列不同, oligo 32-3 和 oligo 32-4 的碱基互补(见表 1). 同样, 32mer 异型寡核苷酸的保留均随着离子对试剂浓度的增加而增强(见图 6), 但在 TEA/PA 体系下, 保留的增长程度明显大于 TEA 体系. 当离子对试剂浓度 ≥ 40 mmol/L 时, 4 条寡核苷酸在 TEA/PA 和 TEA 体系下的保留顺序一致, 即 oligo 32-1 < oligo 32-2 \leq oligo 32-3 < oligo 32-4. 分离度结果(表 6)显示, 同分异构体 oligo 32-1 和 oligo 32-2 在不同浓度的 TEA/PA 体系中均为微弱分离, 由于两者的结构相近, 离子对试剂浓度对其分离无明显影响. 而在 TEA 体系中, oligo 32-1 和 oligo 32-2 几乎完全重叠在一起. 尽管 oligo 32-2 和 oligo 32-3 在碱基组成上存在较大差异, 但是它们在 2 种离子对体系下均无法得到有效分离, 几乎完全重叠. 而互补序列 oligo 32-3 和 oligo 32-4 在 2 种体系下均能很好地分离, 且在 TEA/PA 体系中的分离度大于 TEA 体系.

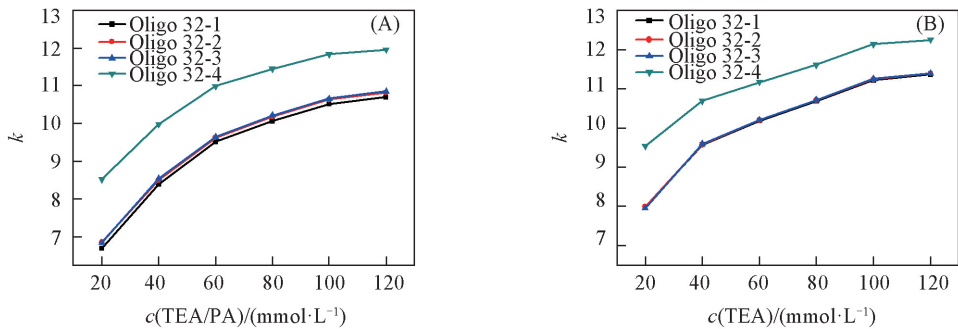


Fig.6 Retention factor (k) of 32mer hetero-oligonucleotides under mobile phases containing different concentrations of ion-pair reagent

(A) TEA/PA; (B) TEA. The chromatographic conditions are the same as those in Fig.2.

Table 6 Resolution of adjacent peaks in 32mer hetero-oligonucleotides under different concentrations of ion-pair reagent

$c_p / (\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1})$	TEA/PA			TEA		
	32-1/32-2	32-2/32-3	32-3/32-4	32-1/32-2	32-2/32-3	32-3/32-4
20	0.49	0.02	4.92	0.10 ^a	0.02 ^b	5.07 ^c
40	0.48	0.13	5.24	0.01	0.09	4.22
60	0.46	0.07	5.16	0.06	0.04	3.84
80	0.48	0.10	4.81	0.11	0.01	3.65
100	0.50	0.10	4.65	0.10	0.05	3.61
120	0.50	0.16	4.48	0.09	0.03	3.42

a. Resolution between 32-3/32-1; b. resolution between 32-1/32-2; c. resolution between 32-2/32-4.

以上结果表明, 在保留上升区间, 同型寡核苷酸之间的分离度及结构差异较大的异型寡核苷酸之间的分离度基本随着离子对试剂浓度的增加而增大, 而对于结构相近的异型寡核苷酸则在低离子对试剂浓度下具有较好的分离效果, 这说明不同类型的寡核苷酸在实现最优分离时所需的保留强度不同, 因而合适的保留强度对于寡核苷酸的分离非常重要. 对于异型寡核苷酸, 在总体分离度上, 中等浓度的混合离子对试剂表现出一定的优势.

2.3 寡核苷酸 IP-RPLC 保留机理的探讨

IP-RPLC 中的主要保留模型为动态离子交换模型^[32]和离子对模型^[26,33].

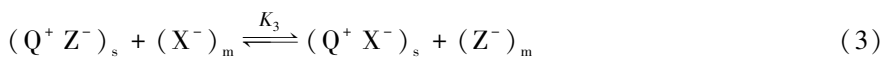
(1) 假设寡核苷酸保留过程中动态离子交换模型占主导地位:

离子对试剂在固定相和流动相之间形成动态吸附、脱附平衡, 并在固定相表面形成双电层:



式中: $(Q^+)_m$ 和 $(Z^-)_m$ 分别为离子对试剂正离子和负离子, 其浓度单位均为 mmol/L; 下标 m 和 s 分别表示固定相和流动相.

溶质离子 X^- 在双电层上与 $(Q^+Z^-)_s$ 之间进行动态离子交换:



溶质 X^- 的保留因子 k 为

$$k = \frac{[Q^+X^-]_s}{\beta[X^-]_m} = \frac{K_1K_2K_3[Q^+]_m}{\beta} \quad (4)$$

式中: β 为相比.

以离子对试剂总浓度 c_p 代替 $[Q^+]_m$, 则式(4)可简化为

$$k = Ac_p \quad (5)$$

式中: A 为常数.

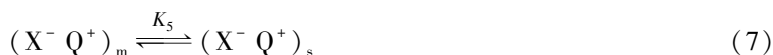
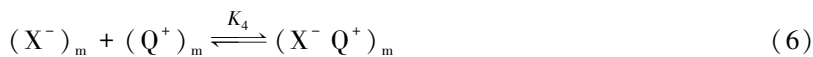
由式(5)可以看出, 在动态离子交换模型中保留因子 k 与离子对试剂总浓度 c_p 成正比, 截距为 0. 由于 $(dC)_{15}$, $(dC)_{20}$ 和 $(dC)_{25}$ 在 20~120 mmol/L 离子对试剂浓度范围内达到保留稳定, 保留基本不受离子对试剂浓度的影响, 故只对同型寡核苷酸 $(dA)_n$, $(dT)_n$, $(dC)_5 \sim (dC)_{10}$, 20mer 异型寡核苷酸和 32mer 异型寡核苷酸的 k 与 c_p 之间的关系按照式(5)进行线性拟合, 结果如表 7 所示. 可见, 尽管 k 与 c_p 存在着一定的线性相关性, 但所有直线的截距都不为 0, 且截距数值较大, 与 k 处于相同数量级. 因而, 动态离子交换模型占主导地位的猜测并不实际.

Table 7 Linear correlation between k and c_p

Oligonucleotide	TEA/PA			TEA		
	Intercept	Slope	R^2	Intercept	Slope	R^2
A10	1.6110	0.0310	0.841	2.9782	0.0266	0.816
A20	2.7694	0.0452	0.830	5.0068	0.0376	0.806
A25	3.2356	0.0480	0.830	5.7163	0.0399	0.804
A30	3.6109	0.0498	0.831	6.2791	0.0417	0.802
T5	6.9595	0.0204	0.834	7.6807	0.0165	0.894
T7	8.8489	0.0268	0.849	9.4400	0.0225	0.911
T10	10.6040	0.0314	0.866	11.1440	0.0274	0.923
T12	11.3850	0.0333	0.868	11.9050	0.0297	0.929
C5	0.2155	0.0027	0.772	0.4297	0.0017	0.496
C6	0.2714	0.0039	0.783	0.5674	0.0025	0.488
C7	0.3539	0.0054	0.808	0.7494	0.0034	0.459
C8	0.4859	0.0071	0.815	1.0169	0.0041	0.397
C9	0.6992	0.0088	0.816	1.4032	0.0046	0.316
Oligo20-1	5.0833	0.0396	0.860	6.3444	0.0330	0.867
Oligo20-2	4.8244	0.0422	0.880	5.9811	0.0353	0.893
Oligo20-3	3.9152	0.0334	0.836	5.2573	0.0266	0.836
Oligo20-4	3.4328	0.0289	0.814	4.9940	0.0239	0.788
Oligo32-1	6.6123	0.0386	0.860	7.9326	0.0319	0.876
Oligo32-2	6.7599	0.0383	0.864	7.9301	0.0322	0.879
Oligo32-3	6.7601	0.0386	0.863	7.9182	0.0324	0.870
Oligo32-4	8.4744	0.0331	0.852	9.3990	0.02617	0.915

(2) 假设寡核苷酸保留过程中主要采取离子对模型:

溶质离子在流动相中首先与离子对试剂通过静电相互作用形成离子对, 然后与固定相发生疏水相互作用.



寡核苷酸保留因子 k 可用下式表示:

$$k = \frac{[X^-Q^+]_s}{\beta([X^-Q^+]_m + [X^-]_m)} = \frac{K_4K_5[Q^+]_m}{\beta(K_4[Q^+]_m + 1)} \quad (8)$$

以离子对试剂总浓度 c_p 代替 $[Q^+]_m$, 则式(8)可简化为:

$$k^{-1} = A_1 + B_1/c_p \quad (9)$$

式中: A_1 和 B_1 为常数, $A_1 = \beta/K_5$, $B_1 = \beta/(K_5K_4)$.

按照式(9)对 k^{-1} 和 c_p 之间进行非线性拟合, 相关系数 R^2 如表 8 所示. 可见, $(dA)_n$, oligo 20 和 oligo 32 (TEA 体系下 oligo 32-4 除外) 的保留因子倒数 k^{-1} 与流动相中离子对试剂总浓度 c_p 的相关系数均大于 0.98, $(dT)_n$ 在 TEA 体系下的相关性略差, R^2 在 0.94~0.95 之间. $(dC)_5 \sim (dC)_{10}$ 在 TEA/PA 体系下 k^{-1} 与 c_p 之间具有良好的相关性 ($R^2 = 0.99$). 在 TEA 体系中, 由于在离子对试剂浓度为 80~120 mmol/L 范围内 $(dC)_5 \sim (dC)_{10}$ 的保留出现稳定后并呈现下降状态[图 4(D)], 因而, 全浓度范围内 k^{-1} 与 c_p 相关性较差, 且随着 $(dC)_n$ 链长的增加相关性持续下降. 然而, 在 20~80 mmol/L TEA 浓度范围内, $(dC)_5 \sim (dC)_{10}$ 的 k^{-1} - c_p 相关性系数分别为 0.996, 0.996, 0.992, 0.990 和 0.980, 相关性显著提高. 以上结果表明, 寡核苷酸在 TEA/PA 和 TEA 体系下的保留均以离子对保留机理为主, 但由于 R^2 均不等于 1, 因而可能还存在着一定的动态离子交换作用.

Table 8 Correlations of k^{-1} - c_p fitted according to Eq.(9)

Oligonucleotide	TEA/PA			TEA		
	A_1	B_1	R^2	A_1	B_1	R^2
A10	0.1012	10.026	0.984	0.1339	4.1449	0.991
A20	0.0750	5.6674	0.985	0.0907	2.2607	0.993
A25	0.0737	4.6767	0.988	0.0834	1.9013	0.994
A30	0.0726	4.0594	0.990	0.0784	1.6810	0.994
T5	0.1035	0.8199	0.987	0.1024	0.5507	0.957
T7	0.0791	0.7760	0.999	0.0815	0.4808	0.955
T10	0.0677	0.5527	0.987	0.0686	0.4111	0.948
T12	0.0636	0.4860	0.980	0.0640	0.3872	0.946
C5	1.3103	69.715	0.984	1.4721	20.595	0.942
C6	0.8572	58.660	0.981	1.0707	16.734	0.937
C7	0.6338	44.098	0.986	0.7867	13.573	0.930
C8	0.5083	30.667	0.990	0.6100	9.5254	0.915
C9	0.4201	19.968	0.993	0.4803	6.1408	0.877
C10	0.3614	11.452	0.994	0.3818	3.6390	0.762
Oligo20-1	0.0901	2.0868	0.998	0.0825	1.3597	0.995
Oligo20-2	0.0881	2.2844	0.998	0.0821	1.2991	0.993
Oligo20-3	0.1079	2.9454	0.999	0.0881	2.2844	0.998
Oligo20-4	0.1228	3.4268	0.997	0.1079	2.9454	0.999
Oligo32-1	0.0825	1.3597	0.995	0.0818	0.8813	0.989
Oligo32-2	0.0821	1.2991	0.993	0.0816	0.8847	0.989
Oligo32-3	0.0817	1.3088	0.994	0.0813	0.8989	0.991
Oligo32-4	0.0773	0.8182	0.988	0.0786	0.5428	0.960

平衡常数可以反映动力学过程, 2 种体系下寡核苷酸的平衡常数 ($K_4 = A_1/B_1$, $K_5 = \beta/A_1$) 计算结果列于表 9. 平衡常数 K_4 反映了寡核苷酸与离子对试剂之间的结合能力. 由表 9 可见, 在 TEA/PA 体系下的 K_4 均小于 TEA 体系下的 K_4 , 这是由于三乙胺和丙胺的 pK_a 分别为 11.01 和 10.60, 因此, 在 pH=7.0 的环境下, 三乙胺带有更多的正电荷, 寡核苷酸与三乙胺之间的静电相互作用大于与丙胺之间的静电相互作用. 对于同型寡核苷酸, K_4 基本随着链长的增加而增大, T₅ 和 C₅ 为特例. 与其它同型寡核苷酸相比, T₅ 和 C₅ 由于链长较短, 链的柔韧性较差, 具有较低的立体位阻, 因而更容易与离子对试剂靠近发生静电相互作用. 选取相同链长的 $(dA)_{10}$, $(dT)_{10}$ 和 $(dC)_{10}$ 进行对比, 并以它们在 TEA/PA 中的保留为例. 可以发现, $(dC)_{10}$ 的平衡常数 K_4 (0.032) 高于 $(dA)_{10}$ (0.010), 说明 $(dC)_{10}$ 比 $(dA)_{10}$ 更容易与离子对试剂之间发生静电相互作用, 导致其随离子对试剂浓度的变化保留增加较快. 而 $(dT)_{10}$ 的平衡常数 K_4 (0.122) 远高于 $(dC)_{10}$ 和 $(dA)_{10}$, 与离子对试剂之间具有更强的静电相互作用. 对于链长相同的 20mer 异型寡核苷酸, 由于二级结构不同, K_4 之间存在着一定的差异, 32mer 异型寡核苷酸呈现出相同的现象. 以上结果表明, K_4 的大小与离子对试剂的种类以及寡核苷酸的种类、电荷和二级结构均相关.

平衡常数 K_5 反映了离子对与固定相之间的疏水相互作用. 由表 9 可以看出, TEA/PA 体系下寡核苷酸的 K_5 均大于 TEA 体系下的 K_5 , 说明尽管三乙胺具有较大的疏水性, 但其立体位阻作用较大, 减少了离子对与固定相之间的接触面积, 导致疏水相互作用降低. 同型寡核苷酸 $(dA)_{10}$, $(dT)_{10}$ 和 $(dC)_{10}$ 在 TEA/PA 体系下的 K_5 分别为 9.881β , 14.771β 和 2.767β , 呈现出依赖碱基疏水性的顺序. 由于 $(dT)_{10}$ 与离子对试剂之间高的静电相互作用, 以及形成离子对后与固定相之间高的疏水相互作用, 其保留远高于 $(dA)_{10}$ 和 $(dC)_{10}$. 总体而言, 三乙胺更容易与寡核苷酸之间形成离子对, 而丙胺由于立体位阻作用小, 使得寡核苷酸可以与固定相之间有着更加直接的作用, 因而混合离子对试剂可以覆盖更宽范围的寡核苷酸, 尤其对异型寡核苷酸的分离表现出明显优势.

Table 9 Equilibrium constants of K_4 and K_5 for oligonucleotides

Oligonucleotide	TEA/PA		TEA		Oligonucleotide	TEA/PA		TEA	
	K_4	K_5	K_4	K_5		K_4	K_5	K_4	K_5
A10	0.010	9.881β	0.0323	7.468β	C8	0.017	1.967β	0.0640	1.639β
A20	0.013	13.333β	0.0401	11.025β	C9	0.021	2.380β	0.0782	2.082β
A25	0.016	13.568β	0.0439	11.990β	C10	0.032	2.767β	0.1049	2.619β
A30	0.018	13.774β	0.0466	12.755β	Oligo20-1	0.043	11.099β	0.0607	12.121β
T5	0.126	9.662β	0.1859	9.766β	Oligo20-2	0.039	11.351β	0.0632	12.180β
T7	0.102	12.642β	0.1695	12.270β	Oligo20-3	0.037	9.268β	0.0386	11.351β
T10	0.122	14.771β	0.1669	14.577β	Oligo20-4	0.036	8.143β	0.0366	9.268β
T12	0.131	15.723β	0.1653	15.625β	Oligo32-1	0.061	12.121β	0.0928	12.225β
C5	0.019	0.763β	0.0715	0.679β	Oligo32-2	0.063	12.180β	0.0922	12.255β
C6	0.015	1.167β	0.0640	0.934β	Oligo32-3	0.062	12.240β	0.0904	12.300β
C7	0.014	1.578β	0.0580	1.271β	Oligo32-4	0.094	12.937β	0.1448	12.723β

综上所述, 分别使用 TEA/PA-AA 混合离子对试剂和 TEAA 单一离子对试剂对寡核苷酸的 IP-RPLC 保留行为进行了研究. 在相同离子对试剂浓度下, 寡核苷酸在 TEA/PA-AA 下的保留均弱于 TEAA 下的保留. 不同类型的寡核苷酸在 TEA/PA-AA 和 TEAA 下的分离选择性表现出差异. 保留因子 k 与离子对试剂总浓度 c_p 之间的关系表明, 2 种体系下的保留均以离子对模型为主, 通过比较反应平衡常数可以了解离子对试剂及寡核苷酸结构对寡核苷酸 IP-RPLC 保留行为的贡献. 总体而言, TEA/PA-AA 混合离子对体系由于包含不同性质的离子对试剂, 可以覆盖更宽范围的寡核苷酸, 尤其在中等离子对试剂浓度下对长度相同结构相近的异型寡核苷酸的分离展现出优势.

参 考 文 献

- [1] Huber C. G., Oefner P. K., Bonn G. K., *J. Chromatogr. A*, **1992**, 599(1/2), 113—118
- [2] Apfell A., Chakel J.A., Fischer S., Lichtenwalter K., Hancock W. S., *Anal. Chem.*, **1997**, 69(7), 1320—1325
- [3] Gilar M., Foutain K. J., Budman Y., Neue U. D., Yardley K. R., Rainville P. D., Russell R. J., Gebler J.C., *J. Chromatogr. A*, **2002**, 958(1/2), 167—182
- [4] Huber C. G., Krajete A., *Anal. Chem.*, **1999**, 71(17), 3730—3739
- [5] Huber C. G., Krajete A., *J. Chromatogr. A*, **2000**, 870(1/2), 413—424
- [6] Buncek M., Backovska V., Holasova A., Radilova H., Safarova M., Kunc F., Haluza R., *Anal. Biochem.*, **2006**, 348(2), 300—306
- [7] Bothner B., Chatman K., Sarkisian M., Siuzdak G., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **1995**, 5(23), 2863—2868
- [8] Apffel A., Chakel J., Fischer S., Lichtenwalter K., Hancock W., *J. Chromatogr. A*, **1997**, 777(1), 3—21
- [9] Kenski D. M., Cooper A. J., Li J. J., Willingham A. T., Haringsma H. J., Young T. A., Kuklin N. A., Jones J. J., Cancilla M. T., McMasters D. R., *Nucleic Acids Res.*, **2010**, 38(2), 660—671
- [10] Dai G., Wei X., Liu Z., Liu S., Marcucci G., Chan K. K., *J. Chromatogr. B*, **2005**, 825(2), 201—213
- [11] Deng P., Chen X., Zhang G., Zhong D., *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **2010**, 52(4), 571—579
- [12] Zhang G., Lin J., Srinivasan K., Kavetskaia O., Duncan J., *Anal. Chem.*, **2007**, 79(9), 3416—3424
- [13] Lin Z., Li W., Dai G., *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **2007**, 44(2), 330—341
- [14] Oberacher H., Parson W., Muhlmann R., Huber C., *Anal. Chem.*, **2001**, 73(21), 5109—5115
- [15] Oberacher H., Oefner P., Parson W., Huber C., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2001**, 40(20), 3828—3830
- [16] Oberacher H., Niederstatter H., Pitterl F., Parson W., *Anal. Chem.*, **2006**, 78(22), 7816—7827
- [17] Erb R., Leithner K., Bernkop-Schnürch A., Oberacher H., *AAPS J.*, **2012**, 14(4), 728—736

- [18] McCarthy S. M., Gilar M., Gebler J., *Anal. Biochem.*, **2009**, 390(2), 181—188
- [19] Gong L. Z., McCullagh J. S. O., *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **2014**, 28(4), 339—350
- [20] Miyaguchi H., *JoVE-J. Vis. Exp.*, **2016**, (115), e54402
- [21] Beverly M., Hartsough K., Machemer L., *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **2005**, 19(12), 1675—1682
- [22] Beverly M., Hartsough K., Machemer L., Pavco P., Lockridge J., *J. Chromatogr. B*, **2006**, 835(1/2), 62—70
- [23] Levin D. S., Shepperd B. T., Gruenloh C. J., *J. Chromatogr. B*, **2011**, 879(19), 1587—1595
- [24] Yuan N., Han S. Y., Yang J., Qiao J. Q., Liu Y., Lian H. Z., *Curr. Anal. Chem.*, **2012**, 8(4), 550—556
- [25] Qiao J. Q., Liang C., Wei L. C., Cao Z. M., Lian H. Z., *J. Sep. Sci.*, **2016**, 39(23), 4502—4511
- [26] Tomlinson E., Riley C. M., Jefferies T. M., *J. Chromatogr. A*, **1979**, 173(1), 89—100
- [27] Wang Y. P., Shen G. Q., Zhu M. H., *Acta Chim. Sinica*, **1993**, 51, 392—396(王延平, 沈国钦, 朱明华. 化学学报, **1993**, 51, 392—396)
- [28] Han S. Y., Qiao J. Q., Zhang Y. Y., Yang L. L., Lian H. Z., Ge X., Chen H. Y., *Chemosphere*, **2011**, 83(2), 131—136
- [29] Huber C. G., Oefner P. J., Bonn G. K., *Anal. Biochem.*, **1993**, 212(2), 351—358
- [30] Lee D. P., Kindsvater J. H., *Anal. Chem.*, **1980**, 52(14), 2425—2428
- [31] Huber C. G., Oefner P. J., Bonn G. K., *J. Chromatogr. A*, **1992**, 599(1/2), 113—118
- [32] Knox J. H., Hartwick R. A., *J Chromatogr.*, **1981**, 204(1), 3—21
- [33] Horvath C., Melander W., Monlar I., *Anal. Chem.*, **1977**, 49(1), 142—154

Retention Behavior of Oligonucleotides under System Containing Mixed Ion-pair Reagents by IP-RPLC[†]

QIAO Junqin, LIANG Chao, CAO Zhaoming, LIAN Hongzhen*

(State Key Laboratory of Analytical Chemistry for Life Science, School of Chemistry & Chemical Engineering and Center of Materials Analysis, Nanjing University, Nanjing 210023, China)

Abstract The retention behaviors of oligonucleotides were investigated under mobile phase containing mixed ion-pair reagents of triethylamine/propylamine-acetate(TEA/PA-AA) and compared with that under classical mobile phase containing triethylamine acetate(TEAA) as ion-pair reagent by ion pair reversed-phase liquid chromatography(IP-RPLC). It is found that the retention of oligonucleotides under TEA/PA-AA system was always weaker than that under TEAA system when the concentration of ion-pair reagents was kept the same. In addition, retention time for most oligonucleotides became longer and longer as the increasing concentration of ion-pair reagents(20—120 mmol/L). As the special case, the retention time of $(dC)_n$ ($n > 10$) was relative stable. The reason should be that the retention of $(dC)_n$ increases fast with the enhanced concentration of ion-pair reagents, and the maximum retention can be achieved under relative low concentration of ion-pair reagents. Additionally, short chain $(dT)_n$ and hetero-oligonucleotides both had better resolution under TEA/PA-AA system than TEAA system. Nevertheless, $(dA)_n$ and $(dC)_n$ both had better resolution under TEAA system. What's more, the dominated separation mechanism of oligonucleotides under the two systems both were ion-pair model, deduced from the relationship between retention factor k and ion-pair reagents concentration c_p . In general, TEA/PA-AA especially under moderate concentration is superior to TEAA in the separation of hetero-oligonucleotides having same chain length. Ion-pair reagent with low concentration improves the compatibility with electrospray ionization-mass spectrometry(ESI-MS), which benefits the qualitative analysis of oligonucleotides.

Keywords Ion pair reversed-phase liquid chromatography(IP-RPLC); Oligonucleotide; Mixed ion-pair reagent; Retention behavior; Retention mechanism (Ed.: N, K)

[†] Supported by the National Natural Science Foundation of China(Nos.21275069, 21577057, 91643105), the Natural Science Foundation of Jiangsu Province, China(No.BK20171335) and the Analysis & Test Fund of Nanjing University, China.