

使用离子对反相色谱法在非变性条件下分析 siRNA 双链含量

LC-471

摘要： 本文建立了一种使用离子对反相超高效液相色谱法（IPRP-UHPLC）在非变性条件下分析 siRNA 双链核酸含量的分析方法。探索了梯度条件、柱温、进样体积对分析的影响。优选的分析条件下，siRNA 双链及其单链杂质 AS 和 SS 峰形良好，分离度大于 2；连续六次进样，siRNA 双链及其单链杂质 AS 和 SS 的保留时间和峰面积的相对标准偏差（RSD）在 0.06~0.12 % 和 0.50~1.17 % 之间，重复性良好；双链峰面积百分比为 99.523%，单链杂质 AS 和 SS 峰面积百分比分别为 0.247% 和 0.230%。方法分离度好、重复性佳，可在非变性条件下分析 siRNA 双链含量。

关键词： 离子对反相色谱 寡核苷酸 非变性 siRNA

技术特点：

- ❖ 优选分析条件可保持 siRNA 双链完整性，实现非变性条件下 siRNA 双链含量分析；
- ❖ 方法分离度好、重复性佳，可准确评估 siRNA 双链含量。

siRNA (Small interfering RNA)，小干扰核苷酸，是由 19~23 个核苷酸组成的双链 RNA。siRNA 作用于 mRNA，通过基因沉默抑制靶蛋白表达，在癌症、遗传及代谢等疾病的治疗中具有广阔的前景。

siRNA 双链结构由正义链 (Sense strand, SS) 和反义链 (Antisense strand, AS) 两条互补单链组成。两条单链分别合成，再经过退火工艺形成双链。siRNA 原料药可能含有残余的单链、双链变种和聚集体等杂质。为确保药物安全性和有效性，需要对双链含量进行控制。

siRNA 双链含量通常结合变性和非变性方法进行分析 and 评估。变性方法是通过高柱温、高 pH 等条件使双链解离为单链进行分析；非变性方法则是需要合适的条件确保双链处于完整不解离的情况下进行分析。变性和非变性方法为双链寡核苷酸杂质研究提

供了互补分析，以确保将药物杂质控制在可接受的范围内。

非变性技术的分析挑战主要是开发在不破坏双链的情况下，又能将双链主成分与其杂质分离的方法。常见的非变性技术有尺寸排阻色谱 (SEC)、阴离子交换色谱 (AEX) 和低温条件下的离子对反相色谱 (IPRP) 方法。SEC 和 AEX 流动相通常含有非挥发性缓冲盐，不能直接进行质谱分析。IPRP 的流动相含挥发性离子对试剂，具有分离能力好且可直接连接质谱分析的优点。

本文建立了一种使用 IPRP-UHPLC 在非变性条件下分析 siRNA 双链含量的分析方法。优选分析条件下，siRNA 双链含量显著提高，与残余单链分离良好，重复性好，供相关检测人员参考。

■ 实验部分

1.1 仪器

岛津超高效液相色谱仪 Nexera LC-40 X3。具体配置为：

系统控制器：SCL-40

自动进样器：SIL-40C X3

检测器：SPD-M40

输液泵：LC-40B X3

柱温箱：CTO-40C

色谱工作站：LabSolutions Ver. 5.128

1.2 分析条件

1.2.1 初始分析条件

色 谱 柱 : Shim-pack Scepter C4-300 100 mm×2.1 mm I.D., 1.9 μm;
P/N: 227-31175-05; 岛津 (上海) 实验器材有限公司

流 动 相 : A 相 -1% 六氟异丙醇 +0.12% 三乙胺水溶液; B 相 - 甲醇

流 速 : 0.4 mL/min 柱 温 : 25°C

进 样 体 积 : 2 μL

检 测 波 长 : 260 nm

洗 脱 方 式 : 梯度洗脱, B 相初始浓度为 15%, 时间程序见表 1。

表 1 梯度洗脱时间程序

Time(min)	Module	Command	Value
6.00	Pumps	Pump B Conc.	33
8.00	Pumps	Pump B Conc.	70
10.00	Pumps	Pump B Conc.	70
10.10	Pumps	Pump B Conc.	15
15.00	Controller	Stop	

1.2.2 优选分析条件

色 谱 柱 : Shim-pack Scepter C4-300 100 mm×2.1 mm I.D., 1.9 μm;
P/N: 227-31175-05; 岛津 (上海) 实验器材有限公司

流 动 相 : A 相 -1% 六氟异丙醇 +0.12% 三乙胺水溶液; B 相 - 甲醇

流 速 : 0.2 mL/min 柱 温 : 12°C

进 样 体 积 : 1 μL

检 测 波 长 : 260 nm

洗 脱 方 式 : 梯度洗脱, B 相初始浓度为 15%, 时间程序见表 2。

表 2 梯度洗脱时间程序

Time(min)	Module	Command	Value
6.00	Pumps	Pump B Conc.	33
7.25	Pumps	Pump B Conc.	58
9.00	Pumps	Pump B Conc.	70
9.20	Pumps	Pump B Conc.	80
11.20	Pumps	Pump B Conc.	80
11.30	Pumps	Pump B Conc.	15
20.00	Controller	Stop	

1.3 样品配制

取 siRNA 原料药适量, 用超纯水溶解并配制成浓度为 0.75 mg/mL 的溶液。

■ 结果与讨论

2.1 初始分析条件下的分析结果

初始分析条件下的 siRNA 样品色谱图和峰表见图 1 和表 3。双链色谱峰峰形欠佳，双链峰面积百分比仅为 94.726%，单链杂质 AS 和 SS 的峰面积百分比分别为 2.223% 和 3.052%。双链含量偏低，推测可能存在色谱柱上解离。

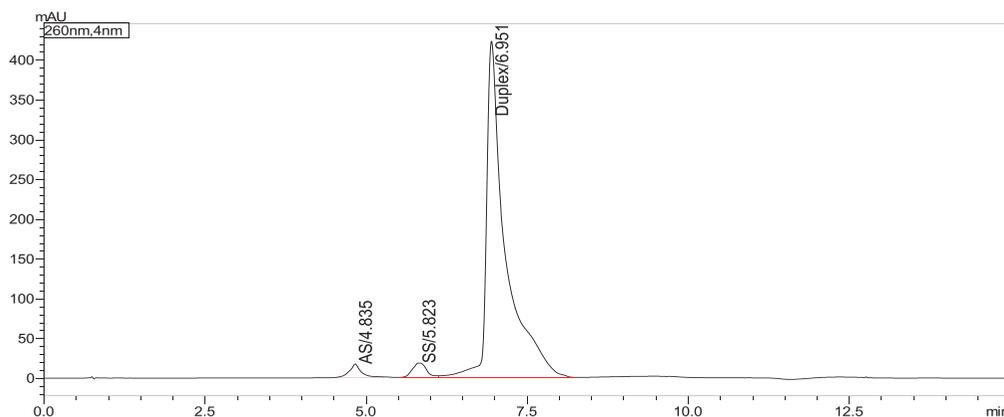


图 1 初始条件下 siRNA 样品色谱图

表 3 初始条件下 siRNA 样品峰表

No.	名称	保留时间 (min)	面积	面积 %
1	AS (反义链)	4.835	200826	2.223
2	SS (正义链)	5.823	275742	3.052
3	Duplex (双链)	6.951	8559155	94.726

2.2 梯度条件的影响

考察了梯度条件对双链含量分析的影响，采用更缓和的梯度程序，双链主成分和单链杂质保留时间增加，双链峰面积百分比提高至 96.991%，表明缓和的梯度程序有助于保持双链的完整，但双链色谱峰峰形欠佳。

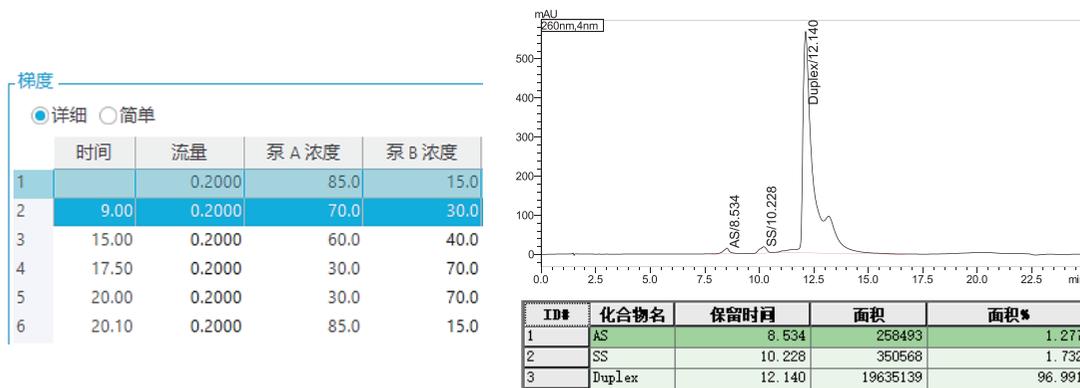


图 2 梯度程序的影响 (左: 梯度程序; 右: 缓和梯度程序下 siRNA 样品色谱图和峰表)

2.3 柱温的影响

考察柱温对双链含量分析的影响，不同柱温下的 siRNA 样品的色谱图如图 3 所示。随着柱温的升高，双链逐渐解离为单链，40℃时已完全解离为单链，表明该 siRNA 双链结构对柱温非常敏感，为尽可能在双链完整的情况下分析，最终优选色谱柱温为 12℃。

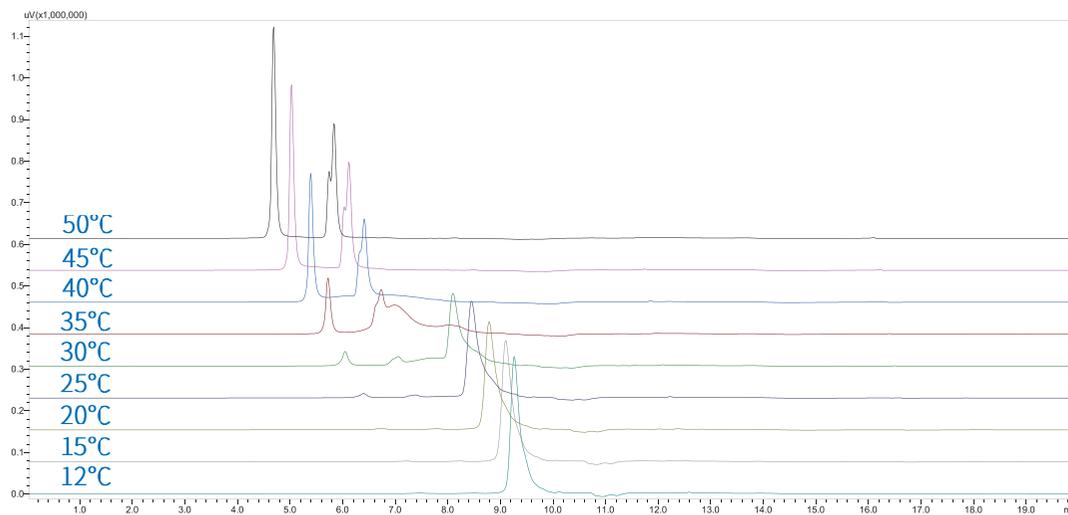


图 3 不同柱温下 siRNA 样品的重叠色谱图

2.4 进样体积的影响

考察进样体积对双链含量分析的影响，不同进样体积下的 siRNA 样品色谱图如图 4 所示。随着进样体积的增加，峰尾出现分叉的趋势，最终优选的进样体积为 1 μL ，此时双链色谱峰峰形良好。

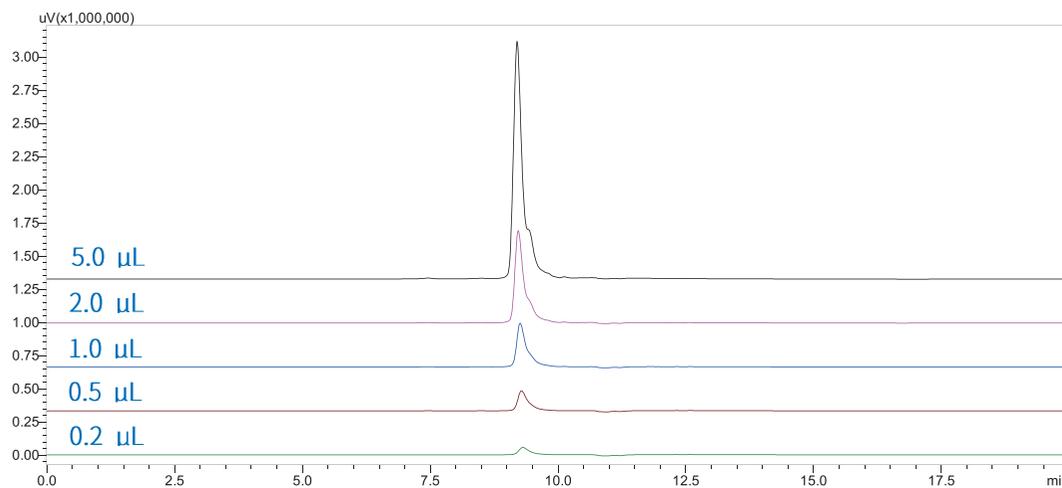


图 4 不同进样体积下 siRNA 样品重叠色谱图

2.5 优选条件下 siRNA 双链含量分析结果

按照 1.2.2 中优选条件分析，siRNA 样品色谱图和峰表见图 5 和表 4。优选条件下，双链色谱峰峰形良好，双链峰面积百分比提高至 99.523%，单链杂质 AS 和 SS 的峰面积百分比分别降至 0.247% 和 0.230%，分离度大于 2，可满足分析需求。

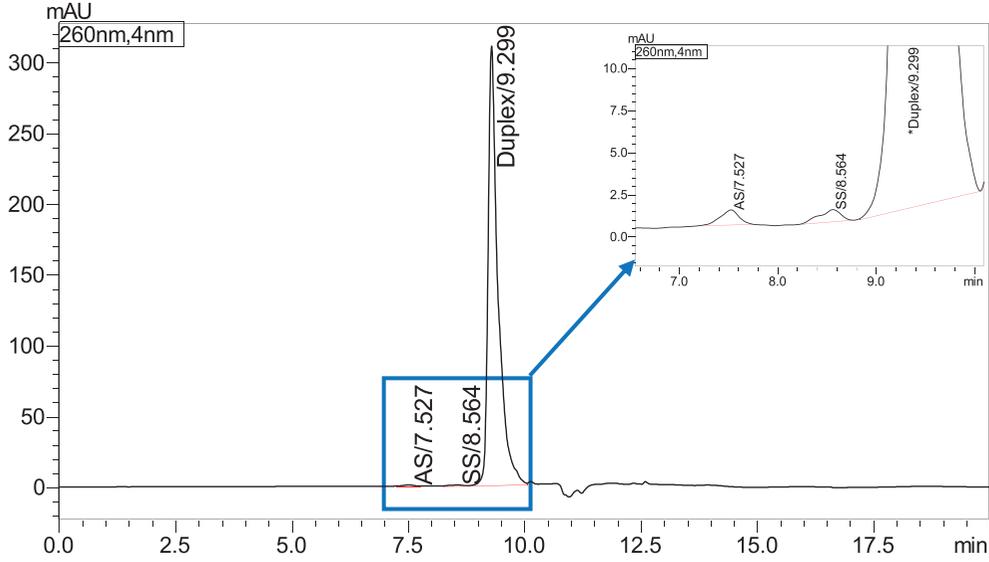


图 5 优选条件下 siRNA 样品色谱图

表 4 优选条件下 siRNA 样品峰表

No.	名称	保留时间 (min)	面积	面积 %	分离度
1	AS	7.527	11401	0.247	--
2	SS	8.564	10630	0.230	2.766
3	Duplex	9.299	4597568	99.523	2.027

2.6 优选条件下重复性分析结果

将 siRNA 样品重复进样 6 次，考察仪器重复性，重叠色谱图和重复性结果见图 6 和表 5。siRNA 双链主成分及其单链杂质 AS 和 SS 保留时间和峰面积的 RSD 分别在 0.06~0.12% 和 0.50~1.17% 之间，重复性良好。

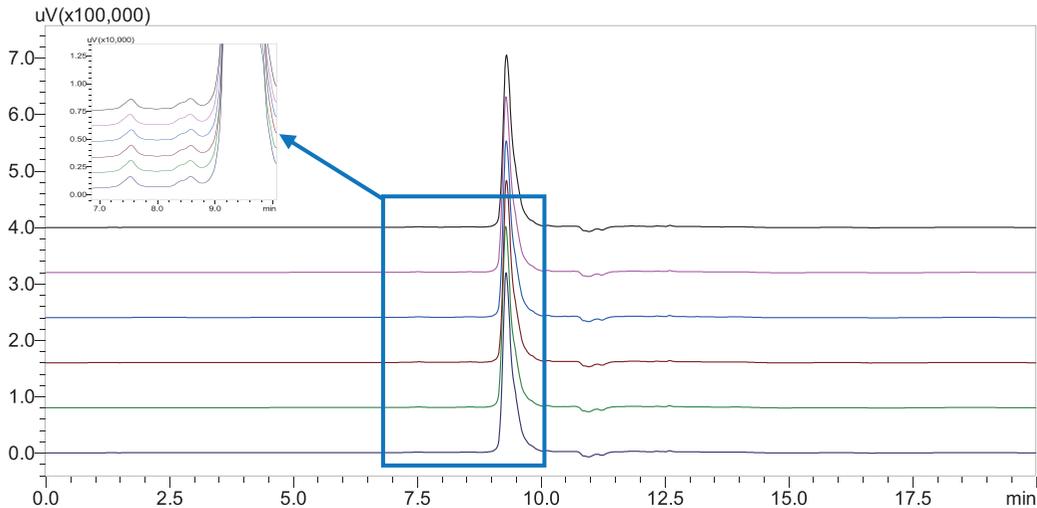


图 6 优选条件下重复性色谱图 (n=6)

表 5 优选条件下重复性结果

No.	名称	保留时间 (RSD %)	峰面积 (RSD %)
1	AS	0.12	1.17
2	SS	0.08	0.66
3	Duplex	0.06	0.50

■ 结论

本文建立了一种使用 IPRP-UHPLC 在非变性条件下分析 siRNA 双链含量的分析方法。探索了梯度条件、柱温、进样体积对分析的影响，这些条件对双链完整性和色谱峰形影响较大，需要细致地优化。优选条件可以实现在非变性条件下分析 siRNA 双链含量，方法分离度好、重复性佳，适合用于 siRNA 双链含量的准确评估。

岛津应用云

