

惰性液相色谱Nexera XS inert 在生物药领域应用文集

101010100101
110020011011
1101010101101
1101010101111
1100111110101
1010101111111
101010100101
110020011011
1101010101101
1101011101111
1100111110101
1010101111111
101010100101
110020011011
1101010101101
1101011101111
1100111110101
1010101111111
101010100101
110020011011
1101010101101
1101011101111
1100111110101
1010101111111

01
01
011
11
0110
1111011010
10101
10101

ING
PATH



前言

随着生物技术进步、全球经济逐渐复苏、人口总量持续增长以及社会老龄化程度的继续加剧，全球生物医药行业持续飞速发展。在我国，生物技术药物作为我国医药产业的重要组成部分，一直是我国重点关注的对象。2022年5月10日，国家发改委印发《“十四五”生物经济规划》，将发展生物医药作为四大重点发展领域之一。

随着国家大力鼓励创新药，尤其是生物创新药的研发，生物医药产业蓬勃发展，生物技术药物的研究也进入了更高一级的平台。与传统化药相比，生物技术药物具有分子量大、异变性高、结构复杂等特点，对其研制需要稳定、先进、灵敏的分析方法，以可靠地检测进行药物研发、生产、质控和临床试验等过程。在生物技术药物分析方法开发中，需要依据药学研究中各个检测项目所需分析方法具备的检测能力，选择合适的检测仪器和检测方法，其中色谱法由于具有高压、高速、高效、高灵敏且不影响分子构型和生化活性等特点，在生物技术药物的鉴别、检查和含量分析中占有重要地位。然而，生物技术药物，如寡核苷酸、磷酸化多肽等，由于化学结构中多磷酸基团、羧基、巯基等基团分析，易与金属产生吸附作用，产生无检出、峰型差、残留、准确低等问题，严重影响生物技术药物的准确分析。此外，生物技术药物液相分析选用的流动相中，常含有高浓度的盐或极高的pH值，长时间使用会对金属部件产生腐蚀等现象，造成分析设备不同程度的损伤，增加维护成本，降低分析效率。因此，克服吸附、提高仪器耐用性，成为生物技术药物达成准确分析亟需解决的问题。

面对当前生物技术药物分析难点，岛津相继推出生物惰性常规液相分析系统 Nexera lite inert、生物兼容液相系统 Nexera Bio 及生物惰性超高效液相分析系统 Nexera XS inert 三种生物液相产品。其中，生物惰性超高效液相分析系统 Nexera XS inert 适用性最广，全面满足生物技术药物研发过程中低吸附、耐腐蚀、耐高压、高效、快速分离的分析需求，适合于核酸、蛋白等生物技术药物的分析。岛津对于该项新型惰性产品的推出，充分发挥仪器性能特点，广泛应用于核酸、蛋白、基因治疗等多项生物技术药物的分析检测之中，并形成《惰性液相色谱 Nexera XS inert 在生物药领域应用文集》，为生物分子的分离提供理想的解决方案，供医药行业从业人员参考。

作为百年企业，岛津以深厚的技术底蕴，紧跟医药市场发展，密切关注生物技术药物研究进程，以新求新，层见叠出，在致敬经典的同时进一步突破创新，不断推出新产品、新方案，与广大用户共同进步、共谋发展。岛津将持续以科学技术不断向人类和社会做出应有的贡献。

岛津企业管理（中国）有限公司
分析中心

目 录

第 1 章 生物惰性超高效液相色谱仪简介	1
第 2 章 应用文集	7
2.1 核酸类药物和疫苗	7
生物惰性超高效液相色谱仪测定 siRNA 含量	8
利用生物惰性液相分析 GalNAc 偶联的寡核苷酸药物纯度	12
LCMS 测定反义寡核苷酸分子量	15
LCMS 测定小干扰核苷酸 siRNA 分子量	19
采用离子交换色谱法分析寡核苷酸并考察流动相 pH 变化对分离的影响	25
通过抑制金属吸附提高核苷酸分析重现性和定量准确性	29
使用生物惰性液相评价 mRNA 疫苗分析方法重复性与残留量	33
利用 LCMS 对 mRNA 和 DNA 生产用核苷酸原料进行定性分析	37
2.2 蛋白类药物	42
生物惰性液相结合尺寸排阻色谱法分析多肽药物中共价结合二聚体和非共价结合二聚体杂质	43
使用生物惰性超高效液相色谱仪分析抗体药物	46
使用尺寸排阻色谱法分析蛋白类药物的聚集体	51
生物惰性液相色谱仪与多角度光散射检测器联用测定双抗分子量	54
2.3 基因治疗药物	57
生物惰性液相色谱分析三种构型的质粒样品	58
生物惰性液相色谱仪测定腺相关病毒空壳率	61
2.4 酶残留定量分析	64
生物惰性液相结合尺寸排阻色谱法检测抗病毒药物原料腺嘌呤中嘌呤核苷磷酸化酶残留量	65

第 1 章 生物惰性超高效液相色谱仪简介

在生物技术药物的液相分析中，生物分子所含化学基团易与金属材质产生相互作用，例如核酸药物中的磷酸基团易于金属发生非特异性吸附，从而导致一系列残留、重复性差、峰拖尾等问题，是生物技术药物准确检测的一个严峻挑战。另外在生物药分析中通常需要使用小粒径色谱柱 以实现优异的色谱分离，但要求仪器拥有更高的耐压性，并且流动相通常具有高盐浓度和极端 pH 值等特点，对生物技术药物进行检测的仪器流路也要具有很好惰性和耐腐蚀的性能。因此，低吸附、耐高压、耐腐蚀等使用需求，成为生物技术药物分析中亟需解决的问题。

面对当前生物技术药物分析需求，岛津与日本京都大学药学研究生院 Yasushi Ishihama 教授在日本科学技术厅 2017 年至 2020 年目标驱动研发的适应性和无缝技术转移计划(A-STEP)项目的支持下进行合作研究，于 2022 年 7 月，基于岛津全新液相机型 LC-40 系列，重磅推出生物惰性超高效液相分析系统 Nexera XS inert，完美满足生物技术药物研发过程中耐腐蚀、耐高压、高效、快速分离的分析需求，为生物分子的分离提供了理想的解决方案。



Nexera XS inert 生物惰性超高效液相色谱仪

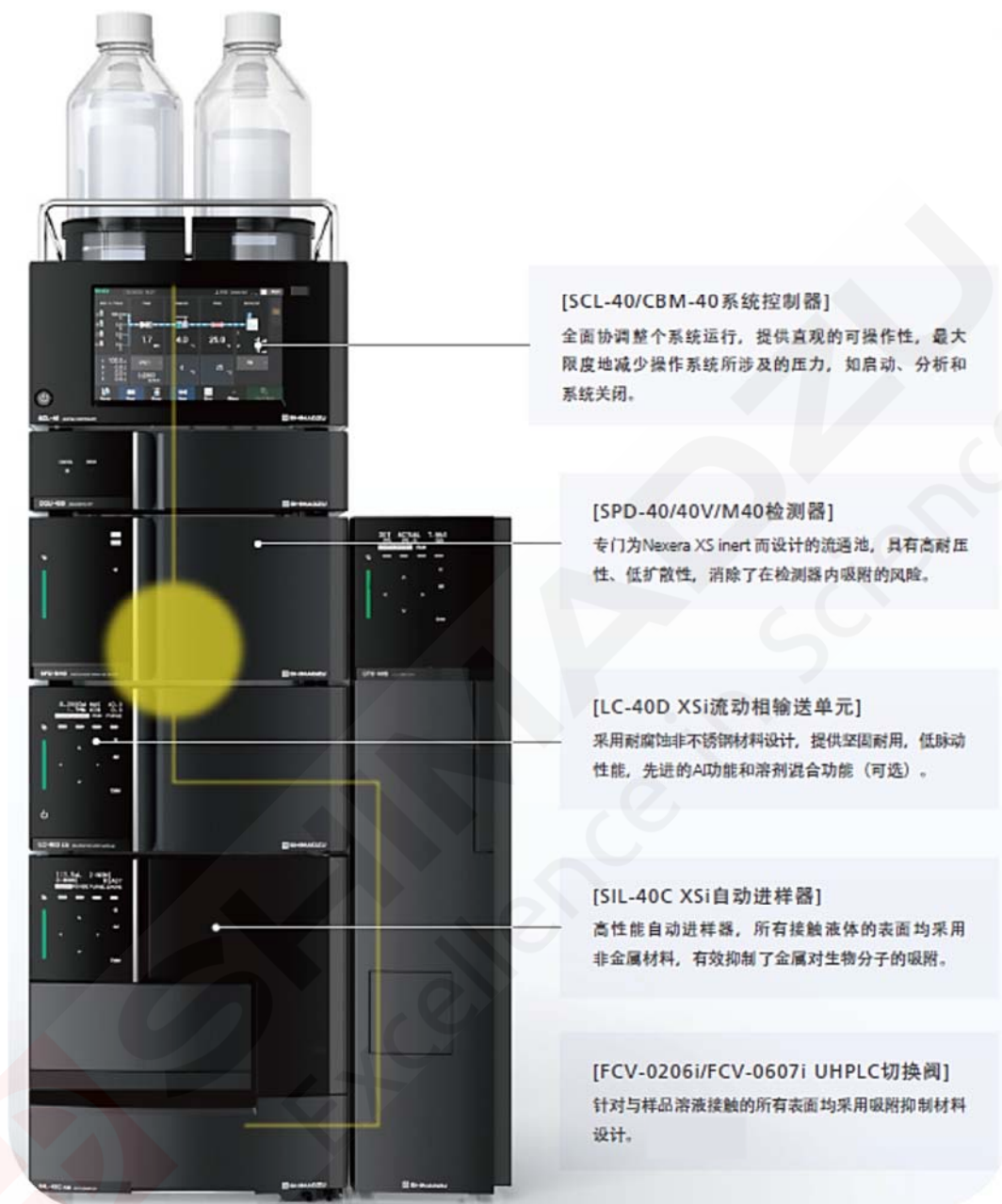
一、硬件介绍

Nexera XS inert 生物惰性超高效液相色谱仪是专门为满足生物药市场而开发，是一款样品无金属接触，完全意义上的生物惰性流路系统，所有润湿表面均由耐腐蚀材料制成，对含有高浓度盐或酸的流动相溶剂保持稳定。该系统有良好的色谱分离性能，应用前景广阔。

1、支持全范围的生物惰性 UHPLC 系统

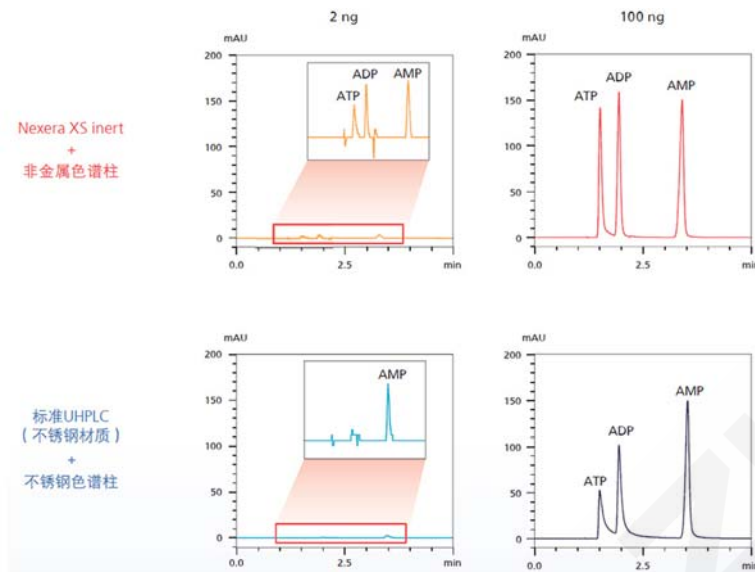
该系统采用不锈钢套管增强的聚醚醚酮（PEEK）管，确保了系统耐压高达 105 MPa，这意味着分析色谱柱可选用小颗粒的长分离柱，实现超高分离效率。Nexera XS inert 生物惰

性系统将 UHPLC 系统的高压耐受性与完全惰性的样品流路完美结合，确保没有润湿金属表面的吸附作用，且具有高耐腐蚀性，支持各种生物技术药物的检测分析。

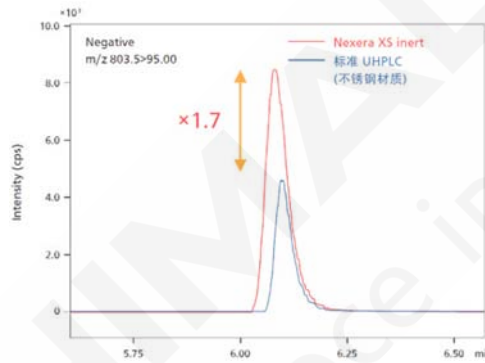


2、手旋拧紧接头，连接即简单又安全

Nexera XS inert 系统具有新开发的 PEEK 内衬管，并配有惰性专用的免工具、手旋拧紧式接头，轻松实现管路、色谱柱间的可靠连接。接头可承受 105 MPa 压力，并且不会产生任何死体积或因过度拧紧而造成损坏的风险。

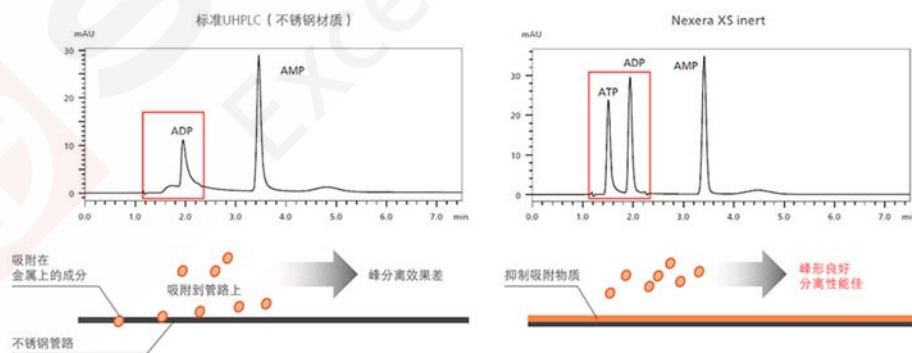


下图为传统 UHPLC 系统和 Nexera XS inert 生物惰性系统分析寡核苷酸的示例。由于 Nexera XS inert 惰性管路，可准确检测到极易吸附到金属材料上的寡核苷酸。



2、不打折扣的分离度

Nexera XS inert 生物惰性系统使用岛津新开发技术，消除样品与内部金属表面的接触。从而抑制了样品流动通道内目标分子的吸附，确保了良好的峰形，并提供了出色的分离。

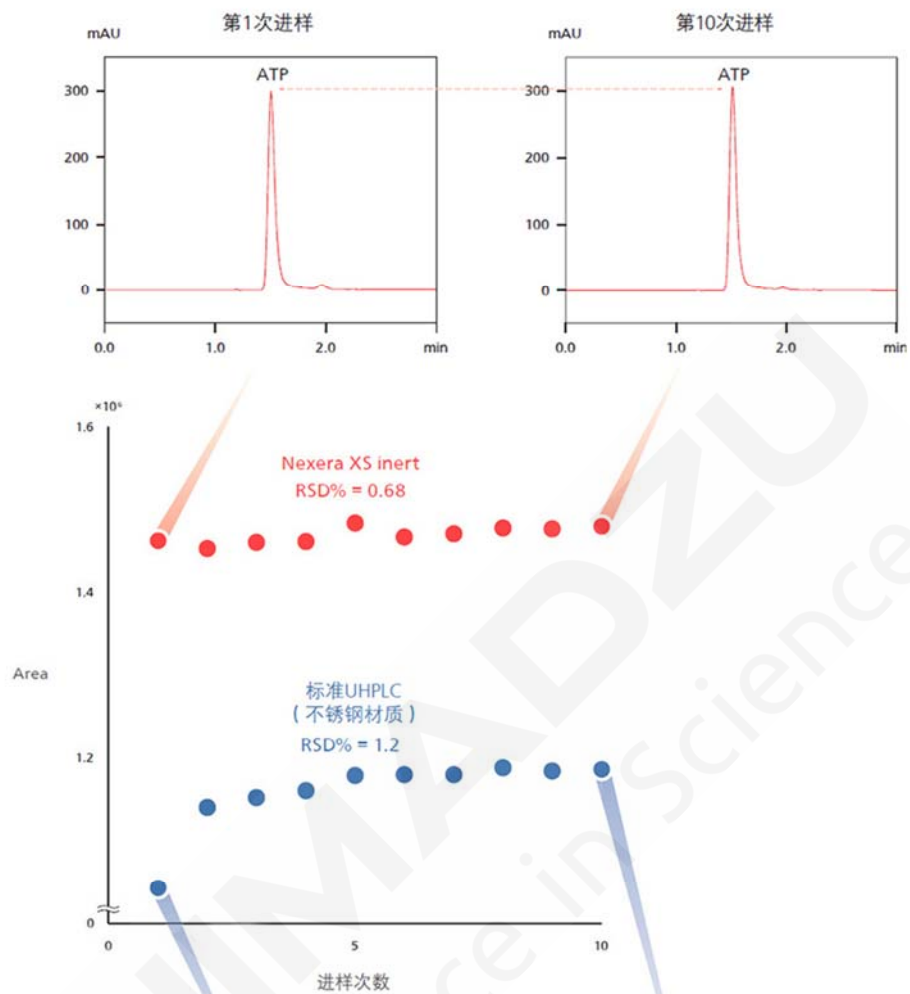


3、不打折扣的重现性和可靠性

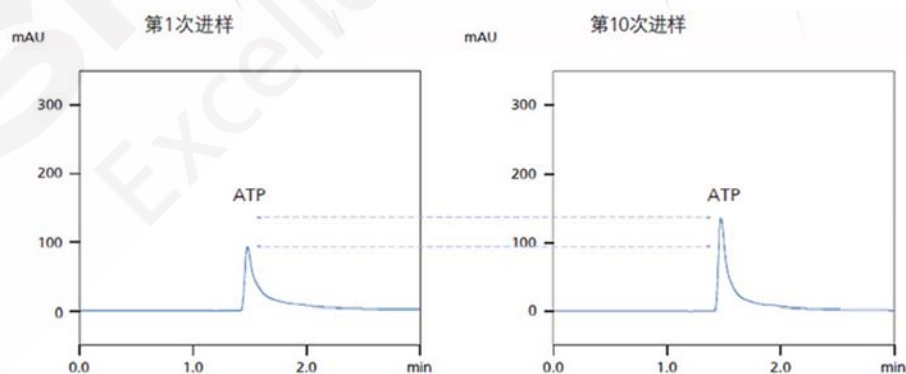
1) 始终如一的分析重现性

为防止由于吸附可能引起的各种问题，在开始数据采集之前，有时会通过反复进样含有目标化合物的样品来使整个系统钝化。这样不仅浪费了珍贵的样品材料和钝化所消耗的时间，而且在长期连续分析中钝化状态的变化会导致最终难以获得可靠的数据。Nexera XS inert 系统无需进行初步钝化，即可在连续分析过程中提供始终如一的可靠数据。

Nexera XS inert
+
非金属色谱柱

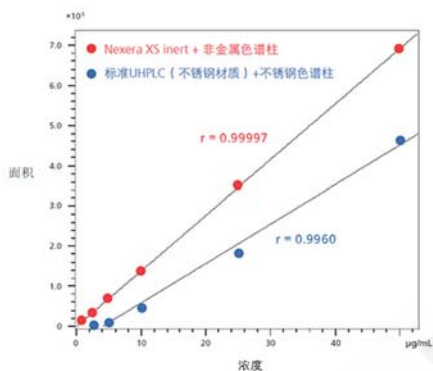
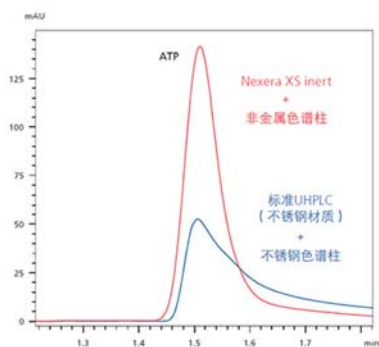


标准UHPLC
(不锈钢材质)
+
不锈钢色谱柱



2) 提高定量分析性能

目标化合物在低浓度区域内的吸附尤为明显,会导致校准曲线线性、检测下限和定量下限变差。Nexera XS inert 可在低浓度区域实现了更大的动态范围和定量精度。



QC样品定量分析结果(不锈钢材质 标准UHPLC)

QC Sample	Spiked Conc. (µg/mL)	Intra-Assay (n = 6)		
		Measured Conc. (µg/mL)	Precision %RSD	Accuracy %
Low	2	2.2	2.88	110.7
Medium	20	21.1	0.797	105.4
High	45	45.5	0.507	101.1

QC样品定量分析结果(Nexera XS inert)

QC Sample	Spiked Conc. (µg/mL)	Intra-Assay (n = 6)		
		Measured Conc. (µg/mL)	Precision %RSD	Accuracy %
Low	2	2.1	0.690	103.9
Medium	20	20.2	0.546	101.1
High	45	45.2	0.358	100.4

此外，生物大分子吸附问题不仅可以发生在仪器内，也会发生在预处理过程中使用的容器、移液管、分析柱和其他设备中。为提升生物分离效率，除在仪器设备检测方面提供完善的解决方案外，岛津同时在色谱柱(如 Metal-Free 系列)、低吸附样品瓶(如 TORAST-H Bio)等方面提供用于测定生物分子理想的实验耗材，从而全方位支持生物技术药物的检测分析。

第 2 章 应用文集

2.1 核酸类药物和疫苗

核酸药物是基因治疗的一种形式，通常利用核酸分子的翻译、调控功能开发所得。根据结构和作用机制，该类药物可分为反义寡核苷酸 (ASO)、小干扰 RNA (siRNA)、微小 RNA (miRNA)、mRNA (mRNA) 及核酸适配体 (aptamer)、抗体核酸偶联药物 (ARC) 等。由于其利用靶细胞内天然存在的转录和翻译机制发挥作用，无需复杂的蛋白质工程生产，具有设计灵活、研发周期短、候选靶点丰富等特点，现核酸类药物的开发已成为继小分子药物、蛋白药物、抗体药物之后的新一代制药技术。

核酸药物典型生产工艺主要分为固相合成-合成后的断裂和脱保护基团-分离纯化-超滤冻干等步骤。无论在药物早期研究还是工艺开发的各个阶段，都需要对原料、中间品以及终产品的样品含量、纯度、杂质以及结构表征等多个方面进行监测、鉴定分析和质量控制。其中，常用的分析技术主要有高效液相色谱法、高效液相色谱-质谱联用法等。由于核酸药物具有电负性、强极性的化学性质，色谱分离方法通常采用反相离子对色谱法和阴离子交换色谱法。反相离子对色谱法通过核苷酸疏水性差异进行分离，流动相中添加的挥发性离子对试剂。阴离子交换色谱法通过电荷差异进行分离，流动相中常用到 NaClO_4 、 NaCl 等不挥发性盐。这些盐类和极端 pH 的长时间使用，会对检测所用的仪器管路产生一定腐蚀性，因此，为降低仪器故障的产生频率，分析仪器的抗腐蚀性需要格外关注。核酸药物富含磷酸基团，容易与金属表面产生非特异性吸附，造成严重残留、峰形拖尾、低浓度无检出、回收率低、校准曲线线性差等一系列棘手的分析问题，给分析工作带来极大挑战。针对以上分析难点，岛津推出生物惰性液相系统 Nexera XS inert。该系统在输液泵等部位采用耐腐蚀合金材质，对于高盐流动相具有极强的耐腐蚀性；在与样品接触的部位采用非金属材料设计，可以很好地抑制核酸药物的金属吸附，获得良好的峰形和出色的重复性。生物惰性液相的低吸附、耐腐蚀等特性，使其成为核酸药物分析的理想仪器。

本章介绍了岛津生物惰性液相 Nexera XS inert、生物惰性液相-质谱联用仪在核酸药物含量、递送介质含量、分子量、纯度和原料等方面的应用案例，供分析人员参考。

生物惰性超高效液相色谱仪测定 siRNA 含量

摘要: 本文采用岛津生物惰性超高效液相色谱仪建立了小干扰 RNA(siRNA)定量方法。结果表明:生物惰性液相色谱管路经 peek 材料内衬后,全流路不含不锈钢材质,可以抑制金属吸附,因此 siRNA 在此系统中无明显残留。在 1~100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 线性范围内线性良好,线性相关系数为 0.9998。精密度实验中,2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 标准溶液保留时间 RSD 小于 0.08%,峰面积 RSD 小于 2.70%。分析实际 siRNA 制剂样品,测定样品中 siRNA 含量为 1.21 mg。实验结果表明,该方法能快速准确地定量分析 siRNA。

关键词: 生物惰性超高效液相色谱仪 Metal free 色谱柱 siRNA

siRNA (Small interfering RNA), 小干扰核苷酸,是由 20-25 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 中含磷酸基团, 与金属接触时易产生吸附现象。常规高效液相色谱仪由于不锈钢管路等部件与 siRNA 接触时产生吸附作用, 影响色谱峰峰形, 且易产生残留, 从而影响定量准确性。除液相色谱仪外, 常规液相色谱柱也是金属吸附的重灾区, 因为色谱柱筛板为网状不锈钢材质, 含磷酸基团的 siRNA 易吸附残留在色谱柱柱头。

本方法采用岛津最新推出生物惰性超高效液相色谱仪, 在保证超高耐压的前提下, 管路经 peek 材料内衬, 实现全流路无不锈钢材质, 抑制金属吸附。色谱柱采用 Metal free 色谱柱, 抑制 siRNA 在色谱柱中的吸附, 实现快速、准确定量分析 siRNA。

1. 实验部分

1.1 仪器

生物惰性超高效液相色谱仪 LC-40D XSi, 具体配置信息如下:

系统控制器	: CBM-40	自动进样器	: SIL-40C XSi
输液泵	: LC-40D XSi	脱气机	: DGU-405
检测器	: UV	色谱工作站	: Labsolutions Ver. 5.114



图 1. 生物惰性超高效液相色谱仪

1.2 分析条件

- 色 谱 柱 : Shim-Pack Scepter C18-120[Metal free] (50 mm×2.1 mm I.D., 3μm), 岛津(上海)实验器材有限公司, P/N: 227-31073-01
- 流 动 相 : A-15mM TEA+400mM HFIP; B-50%A+50%甲醇
- 流 速 : 0.3 mL/min 进 样 体 积 : 1 μL
- 柱 温 : 55 °C 检 测 器 : UV
- 检测器温度 : 40 °C 检 测 波 长 : 260 nm
- 洗 脱 方 式 : 梯度洗脱, B 相起始浓度为 20%, 时间程序如表 1 所示。

表 1. 梯度洗脱时间程序

时间(min)	单元	处理命令	值
5	泵	B.Conc	80
8	泵	B.Conc	80
8.1	泵	B.Conc	20
15	控制器	Stop	

1.3 标准品及样品配制

标准品储备液: 称取标准品适量, 用超纯水溶解稀释成 1 mg/mL;

标准溶液: 取适量对照品储备液, 用超纯水逐级稀释, 配制浓度为: 1、2、5、10、20、50、100 μg/mL 的标准溶液。

冻干制剂样品处理: 取 2 mL 超纯水溶解样品, 用碱性溶液稀释 40 倍, 放置 15 min, 将递送介质和 siRNA 解离, 上机分析。

2. 结果与讨论

2.1 标准溶液色谱图

siRNA 为双链 RNA, 在有机溶剂和高温作用下解离, 故色谱图中为双峰, 色谱图见图 2。siRNA 含磷酸基团, 易在不锈钢管路和金属色谱柱中产生金属吸附, 导致残留, 影响定

量准确性，采用常规超高效液相色谱仪和金属色谱柱，在 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 标准溶液后，分析空白溶液中有残留，空白溶剂色谱图见图 3。本实验采用生物惰性液相色谱仪结合 metal free 色谱柱，全流路不含不锈钢材质，在校准曲线最高点（100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ）siRNA 标准溶液后分析空白溶剂，未检出 siRNA，无残留。

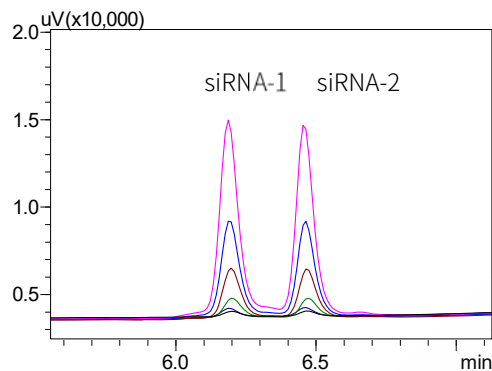


图 2. siRNA 色谱图（浓度 1~100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ）

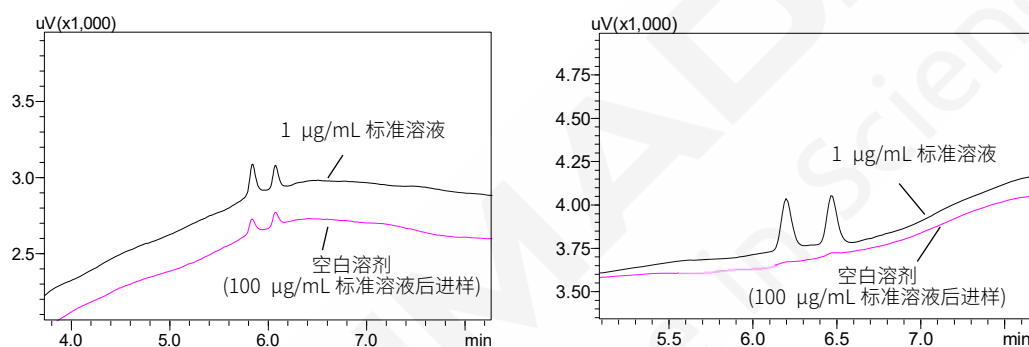


图 3. 空白溶剂与 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 标准溶液色谱图比较

（左：LC-40D XS+Metal 色谱柱，右：LC-40D XSi+Metal free 色谱柱）

2.2 校准曲线

按 1.2 中的分析条件测定标准溶液，浓度为 1~100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ，以浓度为横坐标，两峰峰面积之和为纵坐标，采用组校准外标法建立校准曲线，校准曲线如图 4 所示，线性相关性高、准确度高。

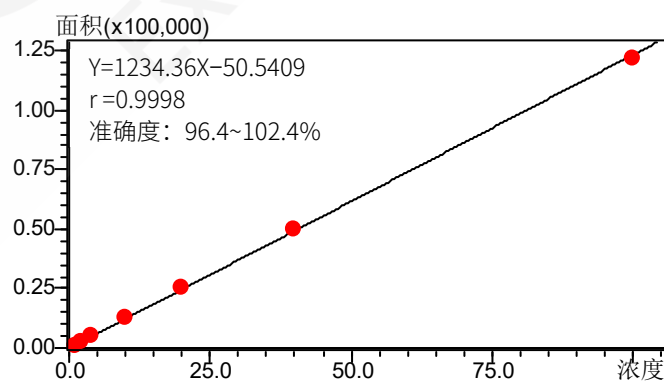


图 4. 校准曲线

2.3 精密度实验

按照 1.2 分析条件，将浓度为 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的标准溶液重复分析 6 次，计算得到 siRNA 保

留时间 RSD 小于 0.08%，峰面积 RSD 小于 2.70%，色谱图见图 5。

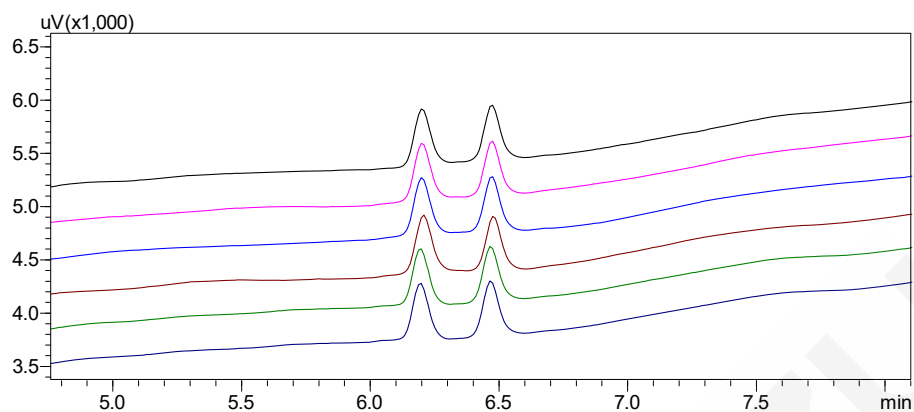


图 5. 精密度实验结果

2.4 样品含量测定

按照 1.3 中处理方法对 siRNA 冻干制剂样品进行处理，连续分析 5 次，考察前处理方法解离递送介质和 siRNA 的稳定性，样品色谱图如图 6 所示，定量结果如表 2 所示，5 次连续分析含量 RSD 为 2.43%，稳定性好。

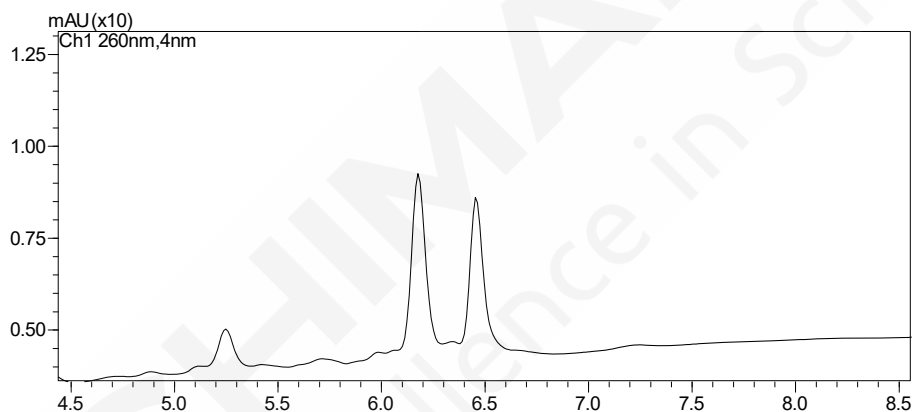


图 6. 样品色谱图

表 2. 样品中 siRNA 定量结果

项目	每份样品中 siRNA 量 (mg)					平均值 (mg)	RSD (%)
	1	2	3	4	5		
结果	1.23	1.21	1.24	1.21	1.16	1.21	2.43

3. 结论

本文采用岛津生物惰性超高效液相色谱仪建立了小干扰 RNA(siRNA)定量方法。该方法中，siRNA 无残留，在 1~100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 线性范围内线性良好，线性相关系数为 0.9998。精密度实验中，2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 标准溶液保留时间 RSD 小于 0.08%，峰面积 RSD 小于 2.70%。分析实际 siRNA 制剂样品，测定样品中 siRNA 含量为 1.21 mg。实验结果表明，该方法能快速准确地定量分析 siRNA。

利用生物惰性液相分析 GalNAc 偶联的寡核苷酸药物纯度

摘要: 本文利用岛津生物惰性液相色谱系统 (Nexera XS inert) 结合反相离子对色谱法, 建立了 GalNAc 偶联的寡核苷酸药物的纯度分析方法。寡核苷酸药物主峰与杂质分离度良好, 且无明显残留, 方法简单、稳定、可靠, 可供相关行业参考。

关键词: 生物惰性液相系统 寡核苷酸药物 纯度 杂质

技术特点:

- ❖ Nexera XS inert 生物惰性系统, 告别金属吸附, 无残留。
- ❖ 使用 metal-free 色谱柱与 Nexera XS inert 配套使用, 可最大限度发挥出金属吸附抑制效果。

寡核苷酸药物通常指由化学合成生产的长度 50 个以内核苷酸组成的一类药物, 包含单链或双链 DNA 或 RNA。近几年, 寡核苷酸药物已广泛应用于遗传疾病、肿瘤、病毒感染和感觉器官等多种疾病的治疗, 具有特异性强、靶点丰富、高效、长效等优点, 有望成为继小分子药物和抗体药物后的新一代疗法。

寡核苷酸一般由自动化的固相法合成工艺生产, 受到合成反应效率和原料纯度等多重因素的影响, 寡核苷酸药物在合成过程后会存在多种不同的杂质, 药物的杂质会影响药物的疗效并引起不良反应。因此, 有必要加强寡核苷酸药物的质量控制, 纯度是寡核苷酸药物质量控制的关键属性。

寡核苷酸含磷酸基团, 与金属接触时易产生非特异性吸附现象, 影响色谱峰峰形, 且易产生残留, 从而影响测定。岛津推出的生物惰性超高效液相色谱仪 Nexera XS inert 将高压耐受性与完全惰性的样品流路完美结合, 确保不会发生金属表面的非特异性吸附作用, 且具有超高耐腐蚀性, 从而为核酸类物质的分析提供了理想的解决方案。本文使用该套仪器对 GalNAc 偶联的寡核苷酸药物纯度进行了分析, 该方法简单、可靠、无明显残留, 可供相关从业人员参考。

1. 实验部分

1.1 仪器

本实验采用生物惰性超高效液相仪 Nexera XS inert 系统, 具体配置为:

系统控制器	: CBM-40	脱气机	: DGU-405
输液泵	: LC-40D XSi×2	自动进样器	: SIL-40C XSi
柱温箱	: CTO-40C	检测器	: SPD-M40A
色谱工作站	: LabSolutions Ver. 5.118		

1.2 分析条件

色谱柱 : Shim-pack Scepter C18-120 [Metal free] (50 mm×2.1 mm I.D.,

1.9 μ m)，岛津（上海）实验器材有限公司，P/N: 227-31072-01

流动相：A-15mM TEA+400mM HFIP；B-50%A+50%甲醇

进样量：2.0 μ L

柱温：50 $^{\circ}$ C

流速：0.2 mL/min

检测波长：258nm

洗脱方式：梯度洗脱，B相初始浓度为 52%，时间程序见表 1

表 1. 梯度洗脱程序

Time	Module	Command	Value
10.00	泵	B.Conc	57
12.00	泵	B.Conc	57
12.10	泵	B.Conc	52
16.00	控制器	Stop	

1.3 样品前处理

称取适量样品以去离子水溶解，配制浓度为 200ppm 的溶液，待测。

2. 结果与讨论

2.1 寡核苷酸药物纯度分析

使用 1.2 分析条件对空白溶剂进行分析，未见干扰峰；对样品进行分析，主峰保留时间 11.310 min，除主峰外，可观测到 5 个杂质峰，杂质峰面积，纯度比例如下表 2 所示，根据面积归一法计算，寡核苷酸药物的纯度为 88.539%；样品分析后，再分析空白溶剂，进而评估寡核苷酸药物的残留，未见明显残留。

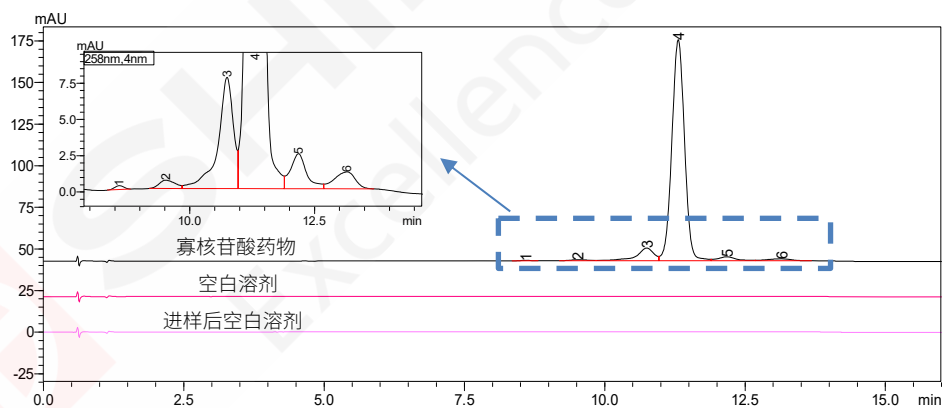


图 1. 寡核苷酸药物纯度分析色谱图

表 2. 寡核苷酸药物峰表

ID	保留时间	面积	空白溶剂 面积%
1	8.591	3499	0.149
2	9.519	12670	0.538
3	10.747	164934	7.007
4	11.310	2084149	88.539
5	12.177	54357	2.309
6	13.151	34335	1.459

2.2 寡核苷酸药物重复性实验

对寡核苷酸药物重复进样 6 次，保留时间及面积重复性如下图 2 和表 3 所示，主峰及杂质峰的保留时间 RSD<0.14%，面积 RSD<1.38%，稳定性良好。

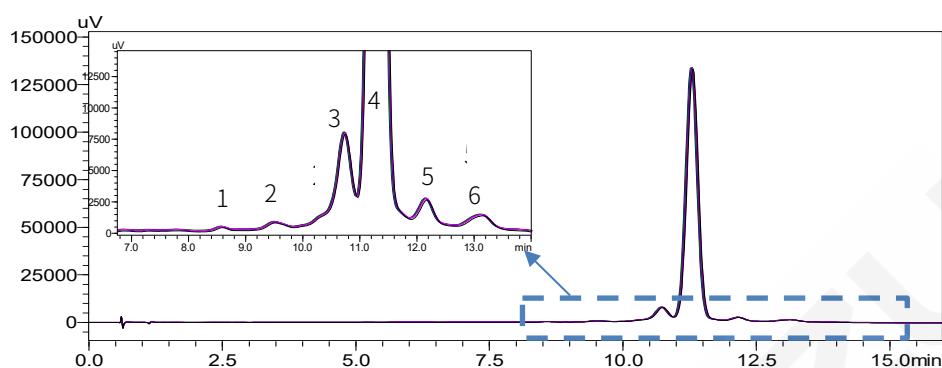


图 2. 寡核苷酸药物重复性色谱图

表 3. 寡核苷酸药物重复性分析结果 (n=6)

名称	保留时间 RSD%	面积 RSD%
1	0.14	1.38
2	0.13	0.97
3	0.12	0.45
4	0.12	0.07
5	0.12	0.78
6	0.13	0.89

3. 结论

本实验建立了一种使用岛津生物惰性超高效液相仪 (Nexera XS inert) 结合 Shim-pack Scepter C18-120 [Metal free] 色谱柱进行寡核苷酸样品的纯度分析方法。空白溶剂无干扰，反相条件下，样品与杂质分离良好，且无残留。方法简单，适用于寡核苷酸药物的质量控制。

LCMS 测定反义寡核苷酸分子量

摘要: 本文使用生物惰性超高效液相色谱四极杆质谱联用仪 LCMS-2050 测定反义寡核苷酸分子量。采用 DUIS (ESI+APCI) 负离子模式对待测样品进行质谱扫描, 使用 LabSolutions 软件对质谱图进行多电荷分析。结果表明, 质谱图中含 5 种多电荷离子, 电荷数量为 4~8。通过多电荷解卷积分析计算得到该反义寡核苷酸样品分子量为 6681.57 Da, 与理论值的偏差为 0.4 Da, 质量准确度高。LCMS-2050 具有质量范围宽的特点, 适合分子量较大的反义寡核苷酸分子量检测。

关键词: 单四极杆质谱 反义寡核苷酸 分子量 质谱多电荷分析

技术特点:

- ❖ 使用岛津最新单四极杆质谱仪, 其采用 ESI/APCI (DUIS) 加热型离子源, 灵敏度高。
- ❖ 反义寡核苷酸在 LCMS-2050 上形成数个多电荷, 通过 LabSolutions 软件中“质谱多电荷分析”功能可准确测定其分子量。

小核酸药物是长度较短、碱基少于 30nt 的一类核酸药物, 其通过作用于致病靶基因或者靶 mRNA, 从根源上调控致病基因的表达, 达到疾病治疗的目的。小核酸药物主要有反义寡核苷酸 (antisense oligonucleotide, ASO)、小干扰 RNA (small interference RNA, siRNA)、微小 RNA (micro RNA, miRNA)、RNA 适配体 (RNA aptamer)、抗体核酸偶联药物 (antibody-siRNA conjugate ARC) 等。

其中, ASO 药物实质上是单链 DNA, 或者 DNA 与 RNA 杂合链, 分子量的测定是其质量控制中非常重要的步骤之一。本文采用 LCMS-2050 采集得到 ASO 质谱图, 并结合岛津 LabSolutions 软件的“质谱多电荷分析”功能对质谱图进行解卷积分析, 可以准确测定 ASO 分子量。LCMS-2050 具有质量范围宽的特点, 适合分子量较大的 ASO 分子量测定。

1. 实验部分

1.1 仪器

生物惰性液相色谱仪 Nexera XS Inert 与单四极杆质谱仪 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		



LCMS-2050

SIMPLY EFFORTLESS

兼顾小型化和高性能

灵敏度 (S/N) <small>* Reserpine 1 µg</small>	100: 1 (RMS)
质量范围	<i>m/z</i> 2-2000
离子化单元	加热型ESI/APCI (DUIS™)
正负离子切换时间	10 msec
扫描速度	15,000 u/s

图 1. 高效液相色谱质谱联用仪 LCMS-2050

1.2 分析条件

色谱柱：Shim-Pack Scepter C18-120[Metal free] (50 mm×2.1 mm I.D., 3µm)，
岛津（上海）实验器材有限公司，P/N: 227-31073-01)

流动相：A相-10mM DIPEA+100mM HFIP，
B相-乙腈 进样体积：5 µL

流速：0.3 mL/min 柱温：55°C

洗脱方式：梯度洗脱，B相初始浓度为5%，时间程序见表1。

表 1. 梯度洗脱程序

Time(min)	Module	Command	Value
1.00	Pumps	Pump B Conc.	5
6.00	Pumps	Pump B Conc.	30
6.10	Pumps	Pump B Conc.	95
7.00	Pumps	Pump B Conc.	95
7.10	Pumps	Pump B Conc.	5
12.00	Control	Stop	

质谱条件

离子源：DUIS (ESI+APCI)	脱溶剂温度：450°C
雾化气：2.0 L/min	接口电压：-2 kV
干燥气：5.0 L/min	扫描模式：Scan (-)
加热气：7.0 L/min	扫描范围：50~2000
D L 温度：250°C	

1.3 样品前处理方法

将反义寡核苷酸样品用水溶解，并稀释至 50 µg/mL。

2. 结果与讨论

2.1 反义寡核苷酸样品色谱图与质谱图

该反义寡核苷酸为单链 DNA，其总离子流图如图 2 所示，质谱图如图 3 所示。从质谱

图得知，样品中不同电荷数的离子质谱信号明显。

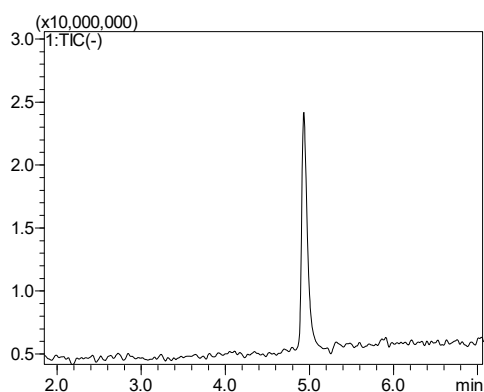


图 2. 反义寡核苷酸总离子流图

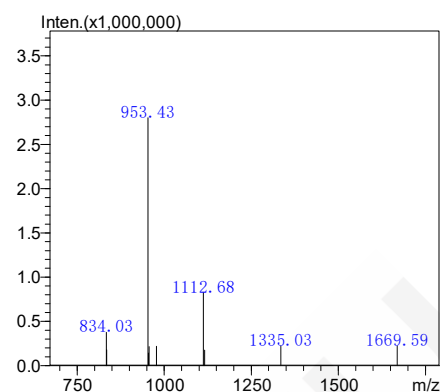


图 3. 反义寡核苷酸质谱图

2.2 质谱多电荷分析结果

通过岛津 LabSolutions™ 软件的解卷积“质谱多电荷分析”功能对样品质谱图进行分析，首先在方法视图编辑多电荷分析参数，然后在定性处理中点击质谱多电荷分析，即可得到分析结果，具体操作步骤如图 4 所示。多电荷分析结果如图 5 所示，从结果得知，该反义寡核苷酸质谱图含 5 个不同电荷数离子峰，电荷数量为 4~8，软件解卷积计算得到分子量为 6681.57 Da，各多电荷峰的质量数标准偏差为 0.436 Da。

该反义寡核苷酸样品序列为 G*C*G*T*T*T*G*C*T*C*T*T*C*T*T*C*T*T*G*C*G，理论分子量为 6681.57 Da，计算分子量与理论分子量偏差为 0.4 Da，计算结果准确度高。

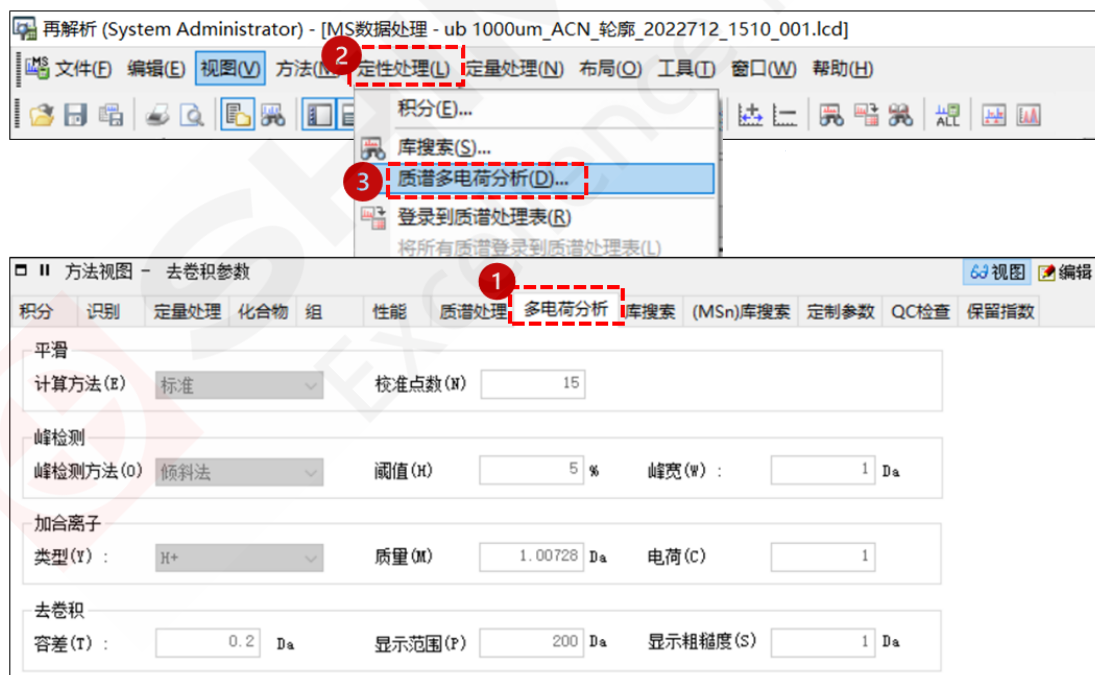


图 4. 岛津 LabSolutions™ 的解卷积功能设置

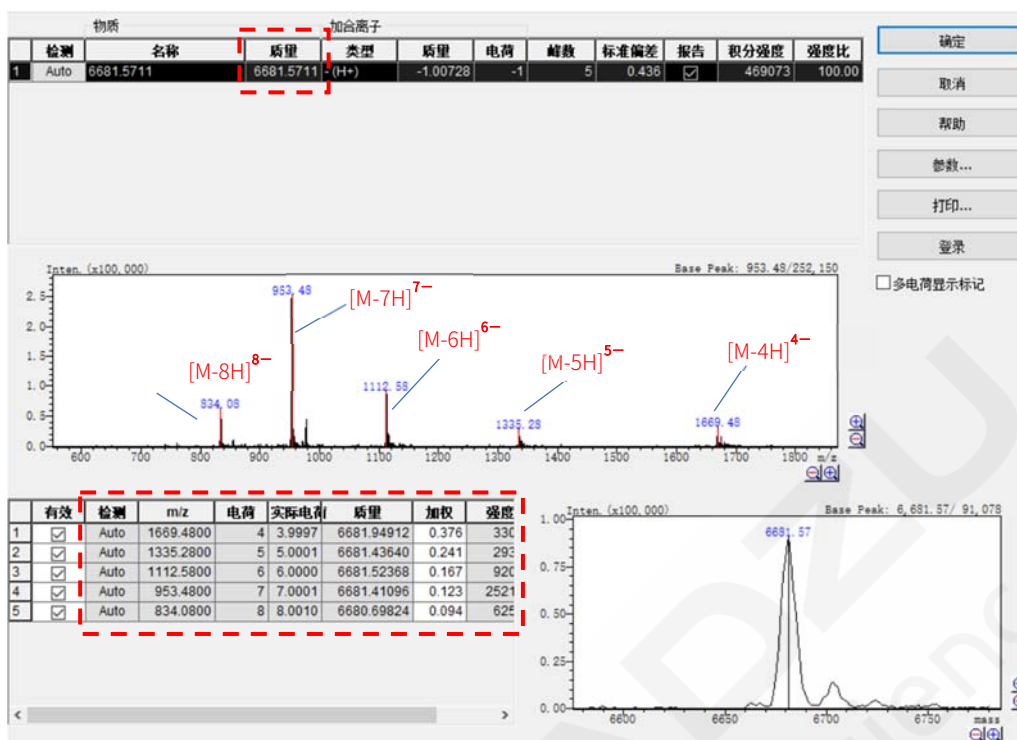


图 5. 反义寡核苷酸分子量解卷积结果

表 2. 理论分子量与实测分子量比较

样品名	序列	理论分子量 (Da)	实测分子量 (Da)	偏差 (Da)
反义寡核苷酸	G*C*G*T*T*T*G*C*T*C*T*T*C*T *T*C*T*T*G*C*G	6681.17	6681.57	0.4

3. 结论

本文使用生物惰性超高效液相色谱四极杆质谱联用仪 LCMS-2050 测定反义寡核苷酸分子量。采用 DUIS (ESI+APCI) 负离子模式对待测样品进行质谱扫描, 使用 LabSolutions 软件的“质谱多电荷分析”功能对质谱图进行解卷积分析。结果显示, 质谱图中含 5 种多电荷离子, 电荷数量为 4~8。通过解卷积分析确认了该反义寡核苷酸样品分子量为 6681.57 Da, 与理论分子量的偏差为 0.4 Da, 质量准确度高。LCMS-2050 具有质量范围宽的特点, 适合分子量较大的反义寡核苷酸分子量检测。

LCMS 测定小干扰核苷酸 siRNA 分子量

摘要：本文使用生物惰性超高效液相色谱仪 Nexera XS inert 与 LCMS-2050 连用，测定了小干扰核苷酸 siRNA 分子量。采用 DUIS (ESI+APCI) 离子源的负离子模式分析待测样品，通过优化流动相和质谱采集参数，去除干扰质谱峰，使用 LabSolutions 软件自带的“质谱多电荷分析”功能准确测定 siRNA 分子量。结果显示，siRNA 正义链质谱图中含 8 种多电荷离子，电荷数量分布为 4~11，多电荷分析测定分子量为 6631.63 Da，与理论值的偏差为 0.34 Da。siRNA 反义链质谱图中含 7 种多电荷离子，电荷数量为 4~10，多电荷分析测定分子量为 6637.64 Da，与理论值的偏差为 0.39 Da，质量准确度高。LCMS-2050 具有质量范围宽的特点，结合 LabSolutions 软件自带的“质谱多电荷分析”功能，可以用于测定 siRNA 分子量。

关键词：单四极杆质谱 siRNA 分子量 质谱多电荷分析

技术特点：

- ❖ 在流动相中添加微量 EDTA，络合系统中 Na⁺，排除了加钠峰对分子量的干扰。
- ❖ 调整 MS 参数中 Qarray 电压，可充分去除六氟异丙醇加和离子。

小核酸药物是长度较短、碱基少于 30 nt 的一类核酸药物，其通过作用于致病靶基因或者靶 mRNA，从根源上调控致病基因的表达，达到疾病治疗的目的。小核酸药物主要有反义寡核苷酸 (antisense oligonucleotide, ASO)、小干扰 RNA (small interference RNA, siRNA)、微小 RNA (micro RNA, miRNA)、RNA 适配体 (RNA aptamer)、抗体核酸偶联药物 (antibody-siRNA conjugate ARC) 等。

其中，siRNA 为双链 RNA，分子量的测定是其质量控制中非常重要的步骤之一。本文采用 LCMS-2050 采集得到 siRNA 质谱图，并结合岛津 LabSolutions 软件的“质谱多电荷分析”功能对质谱图进行解卷积分析，可以准确测定 siRNA 分子量。LCMS-2050 具有质量范围宽的特点，适合分子量较大的 siRNA 分子量测定。

1. 实验部分

1.1 仪器

生物惰性超高效液相色谱四极杆质谱联用仪 LCMS-2050，具体配置信息如下：

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



LCMS-2050

SIMPLY EFFORTLESS

兼顾小型化和高性能

灵敏度 (S/N) <small>*Response 1 pg</small>	100: 1 (RMS)
质量范围	m/z 2-2000
离子化单元	加热型ESI/APCI (DUIS™)
正负离子切换时间	10 msec
扫描速度	15,000 u/s

图 1. 高效液相色谱质谱联用仪 LCMS-2050

1.2 分析条件

- 色谱柱：Shim-Pack Scepter C18-120[Metal free] (50 mm×2.1 mm I.D., 3μm)，
岛津（上海）实验器材有限公司，P/N: 227-31073-01
- 流动相：A相-10mM DIPEA+25mM HFIP+10μM EDTA，B相-乙腈
- 进样体积：10 μL 流速：0.3 mL/min
- 柱温：55°C
- 洗脱方式：梯度洗脱，B相初始浓度为 5%，时间程序见表 1。

表 1. 梯度洗脱程序

Time(min)	Module	Command	Value
1.00	Pumps	Pump B Conc.	5
2.00	Pumps	Pump B Conc.	6
10.00	Pumps	Pump B Conc.	8
10.10	Pumps	Pump B Conc.	95
12.00	Pumps	Pump B Conc.	95
12.10	Pumps	Pump B Conc.	5
16.00	Control	Stop	

质谱条件

离子源：DUIS (ESI+APCI)	脱溶剂温度：450°C
雾化气：2.0 L/min	接口电压：-2 kV
干燥气：5.0 L/min	Qarray 电：-50 V
加热气：7.0 L/min	扫描模式：SCAN (-)
D L 温度：250°C	扫描范围：50~2000

1.3 样品前处理方法

将 siRNA 样品用水溶解，并稀释至 50 μg/mL。

2. 结果与讨论

2.1 方法优化

该 siRNA 样品为双链 RNA，分别为正义链和反义链。在色谱条件下分离为两个峰，其总离子流图如图 2 所示，质谱图如图 3 所示。从质谱图可以看出，质谱峰非常杂乱，这对

siRNA 分子量的确定造成了严重的干扰，所以需优化方法，去除干扰质谱峰。

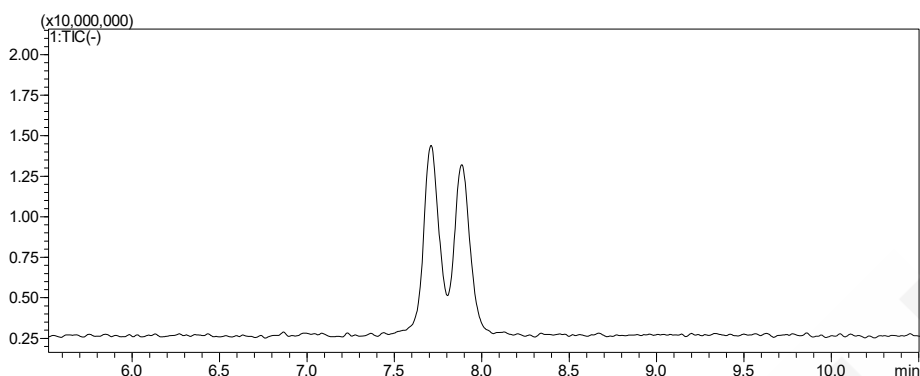


图 2. siRNA 总离子流图

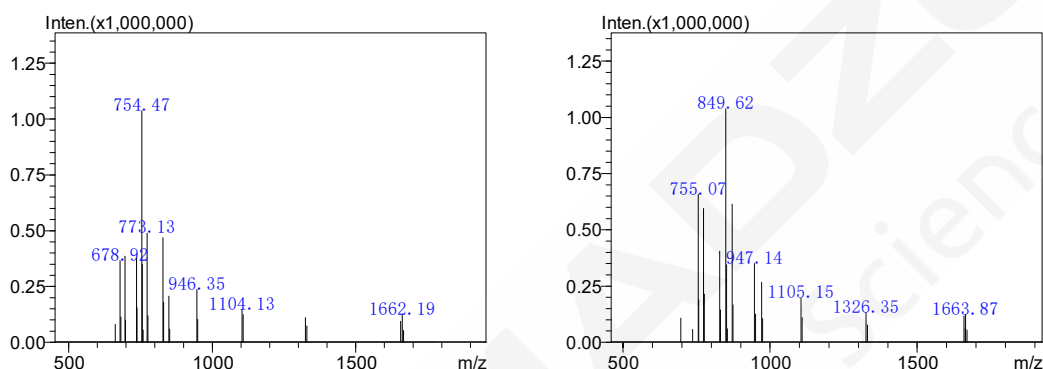
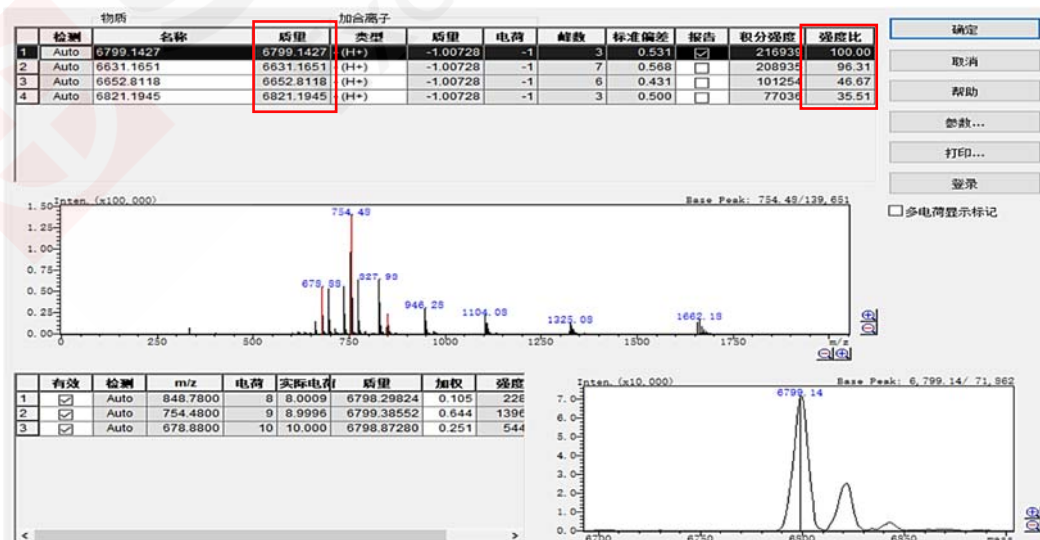


图 3. siRNA 质谱图 (左图: 正义链; 右图: 反义链)

以下以正义链为例，描述方法优化过程。通过岛津 LabSolutions™ 软件“质谱多电荷分析”功能对质谱图进行解卷积分析，分析结果如图 4 所示。质谱图解卷积后得到 4 个分子量，分别为 6799.1、6631.1、6652.8、6821.2Da，其比例分别为 100: 96: 46: 35。其中 6631.1 为 siRNA 正义链分子量，6799.1 与 6631.1 相差 168.0，推测其为正义链加和流动相中六氟异丙醇 (HFIP，分子量为 169) 加和后得到的分子量。6652.8 与 6631.1 相差 21.7，推测其为正义链加和系统中钠离子。6821.2 与 6631.1 相差 190.1，推测为正义链加和 HFIP 和 Na 后得到的分子量。



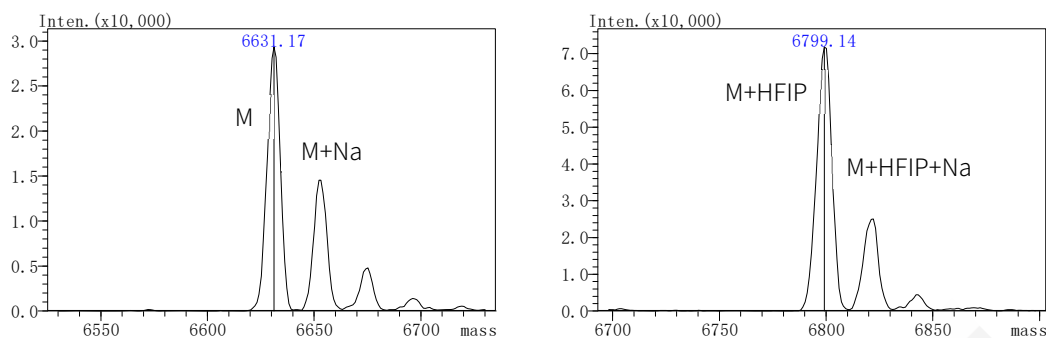


图 4. siRNA 分子量解卷积结果

为了去除质谱图中的加和离子，首先在流动相中添加 10 μM EDTA，用于络合系统中 Na^+ ，去除 M+Na 峰。多电荷解卷积结果如图 5 所示，结果显示 siRNA 已无明显加钠峰。

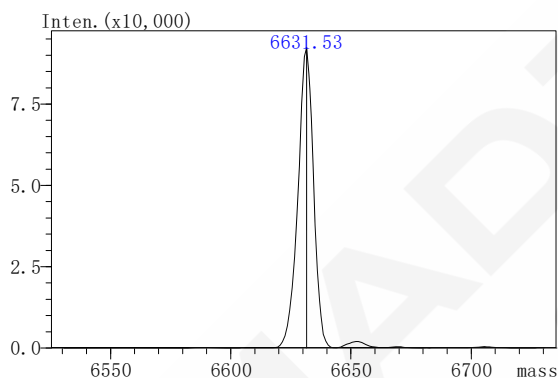
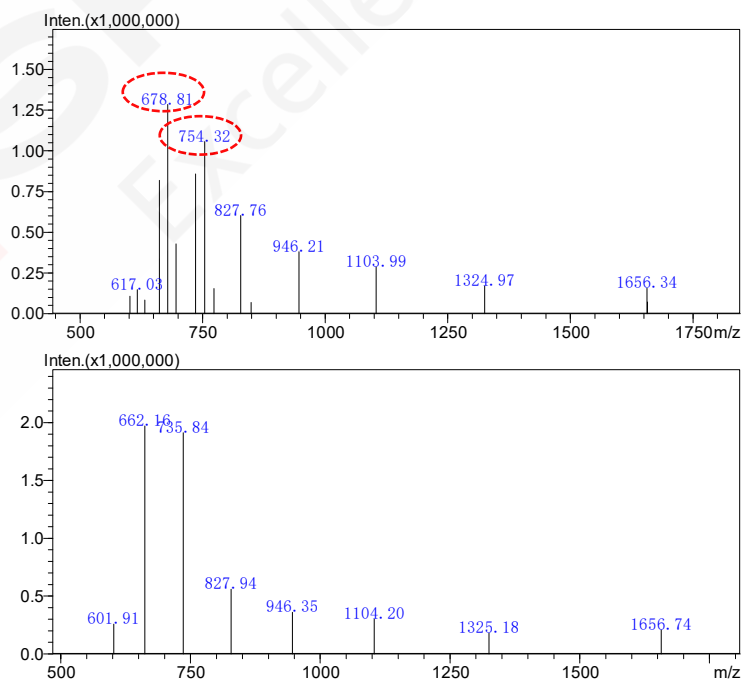


图 5. 流动相加入 EDTA 后 siRNA 分子量解卷积结果

为了去除 HFIP 加和峰，本实验对 Qarray 电压进行调整。将 Qarray 电压分别设置为 -20、-50、-80V，得到的质谱图如图 6 所示。从图可知，当 Qarray 电压为 -20V 时，质谱图中还是有 678.81、754.31 等正义链加和 HFIP 后的多电荷峰。当 Qarray 电压为 -50V 时，去除了正义链加和 HFIP 的多电荷峰，质谱图变得非常干净。当进一步加大 Qarray 电压至 -80V 时，带电荷较多的质谱峰响应明显下降，且产生了新的碎裂。所以最终确定 Qarray 电压为 -50V。



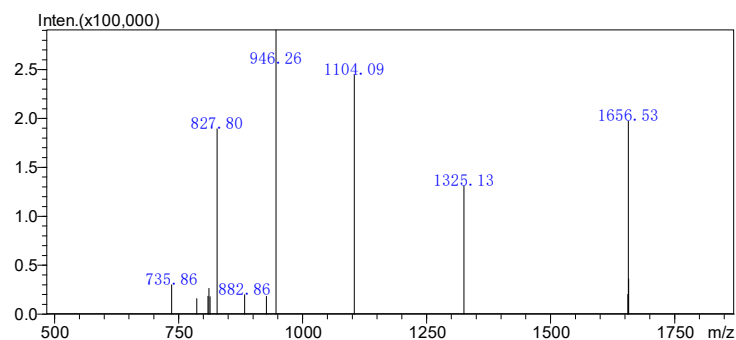
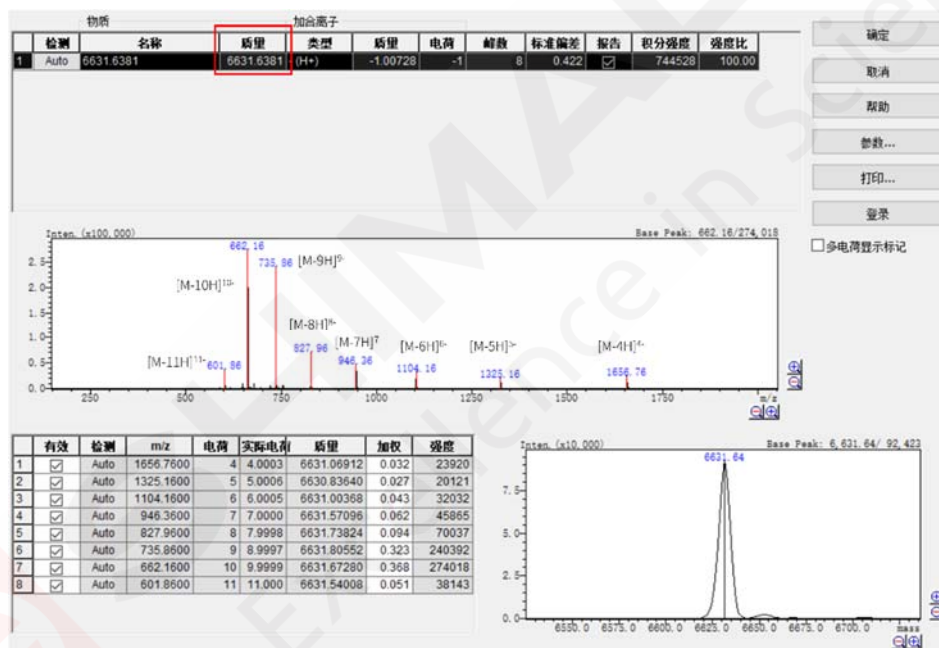


图 6. 不同 Qarray 电压得到的 siRNA 质谱图 (上: -20V, 中: -50V, 下: -80V)

2.2 质谱多电荷分析结果

对优化后得到的质谱图进行多电荷解卷积分析, 分析结果如图 7 所示。从结果得知, 该 siRNA 正义链质谱图含 8 个不同电荷数离子峰, 电荷数量为 4~11, 软件解卷积计算得到分子量为 6631.63 Da, 各多电荷峰的质量数标准偏差为 0.422 Da。siRNA 反义链质谱图含 7 个不同电荷数离子峰, 电荷数量为 4~10, 软件解卷积计算得到分子量为 6637.64 Da, 各多电荷峰的质量数标准偏差为 0.569 Da。



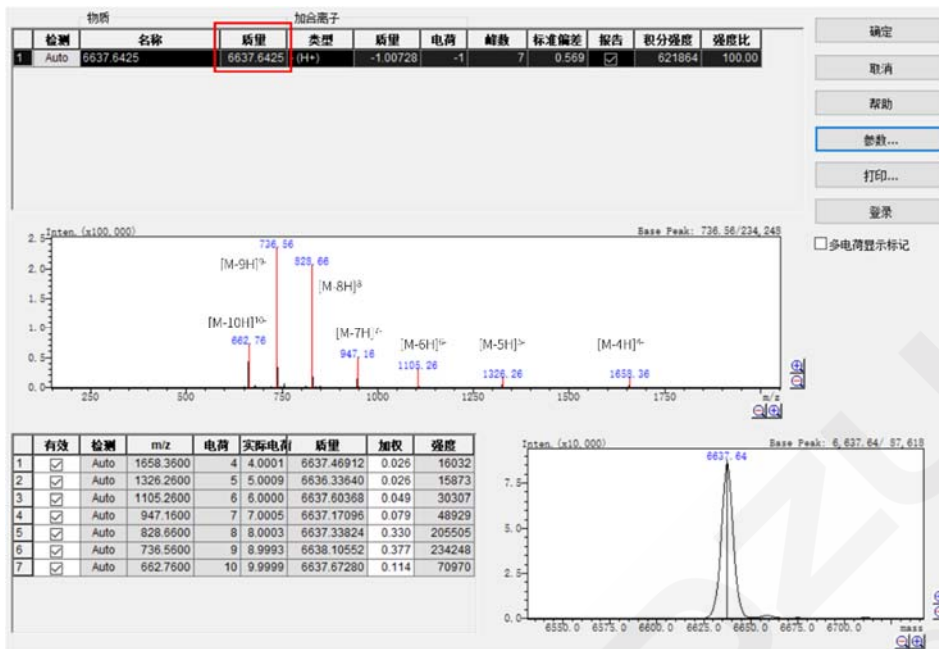


图 7. siRNA 正义链与反义链分子量解卷积结果

该 siRNA 正义链和反义链序列如表 2 所示，理论分子量分别为 6631.97 和 6638.03Da，实测分子量与理论分子量的偏差分别为 0.34 和 0.39 Da。

表 2. 理论分子量与实测分子量比较

样品名	序列	理论分子量 (Da)	实测分子量 (Da)	偏差 (Da)
siRNA 正义链	AUGGAAUACUCUUGGUUACdTdT	6631.97	6631.63	0.34
siRNA 反义链	GUAACCAAGAGUAUCCAUDdT	6638.03	6637.64	0.39

3. 结论

本文使用生物惰性超高效液相色谱仪 NexeraXS inert 与 LCMS-2050 连用，测定了小干扰核苷酸 siRNA 分子量。通过方法优化，去除了质谱图中干扰离子峰，结合 LabSolutions 软件质谱多电荷分析功能准确测得了 siRNA 分子量。

采用离子交换色谱法分析寡核苷酸并考察流动相 pH 变化对分离的影响

摘要：本文使用生物惰性超高效液相色谱仪 Nexera™ XS inert 建立以碱基为单位分离短链寡核苷酸的分析方法，并展现良好重现性。通过该分析方法，目标寡核苷酸可与化学合成过程中使用的保护基等杂质分离。此外，实验发现，通过管理流动相的 pH 变化，可获得稳定的分析结果。

关键词：生物惰性超高效液相色谱仪 寡核苷酸 pH

核酸类药物，例如反义寡核苷酸，可通过与细胞内外靶基因等的相互作用发挥药效。与传统的小分子药物不同，可在基因水平治疗疾病，因此继抗体药物之后，成为备受关注的下一代生物药物。寡核苷酸药物主要通过化学合成进行制造，其合成过程也会生成许多杂质，例如寡核苷酸短序列和保护基团杂质，因此需要合理地分离和纯化寡核苷酸。

本文建立了一种使用离子交换色谱法结合生物惰性液相色谱分离不同序列长度寡核苷酸的分析方法，假定较短序列的寡核苷酸组分为合成过程中可能产生的短序列杂质，并考察了流动相 pH 变化对分析结果的影响。岛津生物惰性超高效液相色谱仪“Nexera XS inert”可以出色地抑制含磷酸基团化合物的金属表面吸附，获得优异的峰型、良好的重现性和出色的灵敏度。

1. 样品制备

寡核苷酸样品序列如表 1 所示。目标寡核苷酸序列长度为 20 mer。序列长度 16~19 mer 的寡核苷酸被假定为合成过程中产生的短序列杂质。两者均为未修饰的单链 DNA，通过固相合成法 (HPLC 纯化) 制备。将表 1 中五种序列长度的寡核苷酸以水溶解，配制为 5 μmol/L 的混合标准品。

表 1. 分析对象样品

	Sequence (5'→3')	Length (mer)
1	TCTTGGTTACATGAAA	16
2	TCTTGGTTACATGAAAT	17
3	TCTTGGTTACATGAAATC	18
4	TCTTGGTTACATGAAATCC	19
5	TCTTGGTTACATGAAATCCC	20

2. 寡核苷酸的分析

使用离子交换色谱法进行分析时，通过流动相中盐浓度或 pH 的改变来分离和洗脱目标物。本实验采用洗脱强度高的、含有高氯酸钠的氢氧化钠水溶液作为流动相 (表 2)。离子交换色谱法通常根据寡核苷酸中的磷酸基数量，即负电荷差异进行分离。因此，通常按照链长由短至长的顺序洗脱。5 种序列的寡核苷酸混合样品的色谱图如图 1 所示。可见，各寡核苷

酸根据序列长度进行分离。

表 2. 分析条件

系统	:	Nexera XS inert
色谱柱	:	Shim-pack™ Bio IEX Q-NP (100 mm × 4.6 mm I.D., 5 μm) *1
流动相 A	:	10 mmol/L NaOH
流动相 B	:	含 1 mol/L NaClO ₄ 的 10 mmol/L NaOH
流速	:	0.8 mL/min
时间程序 (B 浓度)	:	25-32.5%(0-15 min)→100%(15-20 min)→25%(20-25 min)
柱温	:	30 °C
进样体积	:	4 μL
检测	:	UV 260 nm (SPD-M40), Standard cell
样品瓶	:	岛津 1.1 mL 样品瓶*2

*1 P/N: 227-31003-03, *2 P/N: 228-21283-91

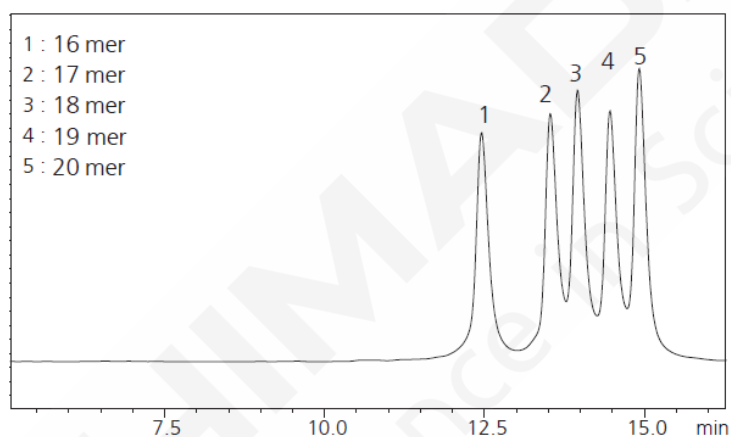


图 1. 寡核苷酸混合样品的色谱图

3. 重现性

16~20 mer 的寡核苷酸混合样品，重复分析 6 次，保留时间和峰面积的相对标准偏差 (%RSD) 如表 3 所示。两项指标均低于 1%，分析重复性良好。

表 3. 各成分相对标准偏差 (%RSD, n=6)

长度(mer)	保留时间	面积值
16	0.138	0.224
17	0.105	0.335
18	0.098	0.494
19	0.085	0.161
20	0.075	0.307

4. 含杂质的混合样品分析

4 种序列的寡核苷酸样品经过 HPLC 纯化, 1 种序列的寡核苷酸样品仅进行脱盐处理, 未经 HPLC 纯化, 将这五种序列长度的寡核苷酸样品配制为 5 $\mu\text{mol/L}$ 的混合样品。包含脱盐纯化品的混合样品与仅包含 HPLC 纯化品的混合样品空白色谱图如图 2 所示。发现不仅可以分离目标寡核苷酸, 还可以分离游离保护基等杂质和不完全长度寡核苷酸链等杂质。

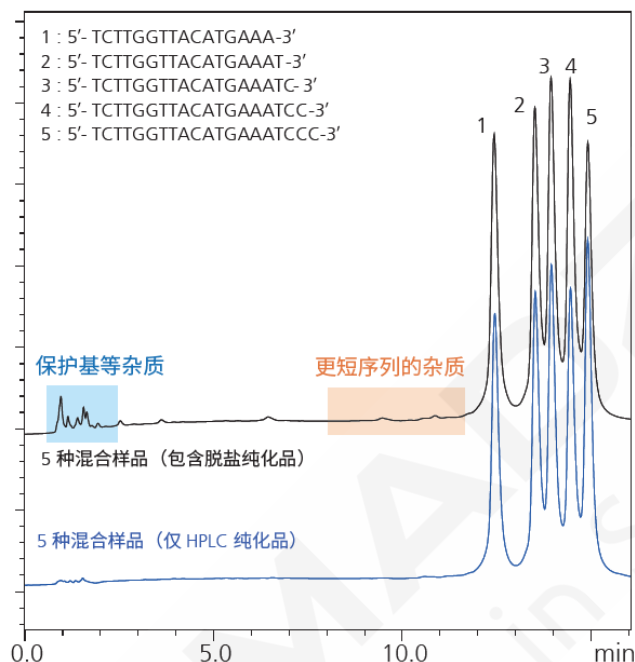


图 2. 包含杂质的寡核苷酸混合样品的色谱图

5. 流动相 pH 变化对保留时间产生的影响

如前文所述, 使用离子交换色谱法分析寡核苷酸时, 通过盐浓度梯度使目标物分离、洗脱。众所周知, 碱性流动相会吸收空气中的二氧化碳, 导致 pH 发生改变。离子交换色谱法根据分析物电荷差异进行分离, 故流动相 pH 的微小变化可能对分析结果产生较大影响。因此, 为了获得稳定的分析结果, 抑制流动相的 pH 变化至关重要。

于是, 我们比较了使用标准流动相瓶盖和带有能防止流动相挥发的过滤器的流动相瓶盖, 分别在流动相制备当天和 2 天后进行分析的效果。各自的寡核苷酸混合样品色谱图如图 3 所示, 以制备当天的值为 100, 各流动相 pH 的变化率如图 4 所示。

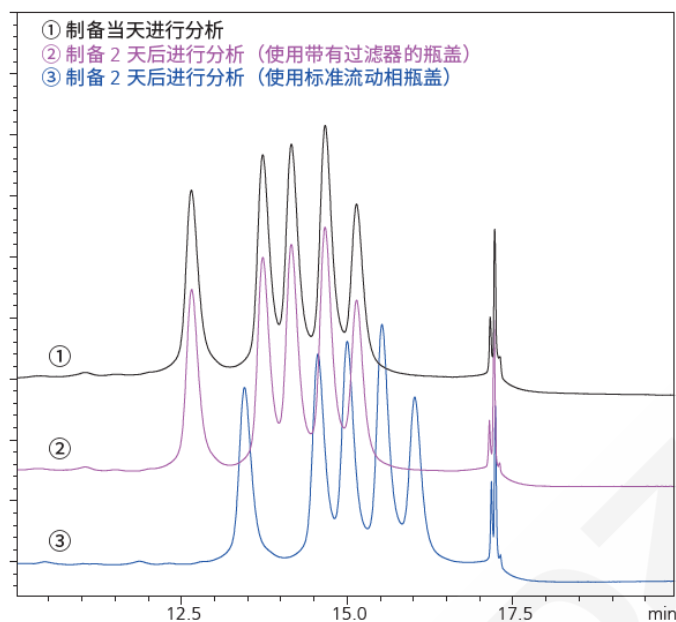


图 3. 流动相制备当天及 2 天后寡核苷酸混合样品的色谱图

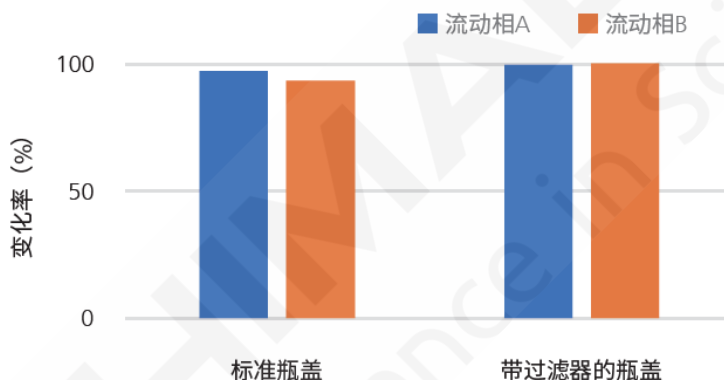


图 4. 相比流动相制备当天，制备 2 天后的 pH 变化率

使用标准流动相瓶盖时，与流动相制备当天 (①) 相比，随着 pH 的变化，保留时间平均增加 8% (③)，而使用带有过滤器的瓶盖时，保留时间几乎没有变化 (②)。由此可知，使用带有过滤器的瓶盖可抑制流动相 pH 的变化，获得稳定的分析结果。

6. 结论

本文介绍了使用离子交换色谱法结合 Nexera XS inert 和 Shim-pack Bio IEX 分析寡核苷酸的案例，可将化学合成过程中产生的保护基等杂质、以及不完全合成产生的不同链长的寡核苷酸与目标寡核苷酸成功分离，展现了良好的重现性。由于流动相的 pH 变化会对分析物的保留时间产生影响，因此流动相的 pH 控制对于稳定地分析十分重要。此外，使用生物惰性系统也有助于获得良好的分析稳定性。

Nexera 和 Shim-pack 是岛津制作所株式会社在日本和其他国家的商标。

通过抑制金属吸附提高核苷酸分析重现性和定量准确性

摘要：本文使用超高效液相色谱仪“Nexera XS inert”系统与无金属色谱柱，可抑制含磷酸基团化合物的金属吸附，可获得峰形良好及峰面积重复性好的数据。该系统对于分析低浓度的磷酸基团化合物具有高灵敏度、高精密度的特点。此外，Nexera XS inert 不需要进行酸清洗、添加螯合剂、使用高浓度样品进行掩盖，可缩短分析时间和减少样品消耗。

关键词：生物惰性超高效液相色谱仪 核苷酸 重现性 准确性

通常用于 HPLC 流路管线的不锈钢兼具优异的耐压性、耐腐蚀性，但由于是金属，会与具有磷酸基团的化合物产生相互作用，经常引起峰形变差和强度降低。为抑制此金属吸附，会使用磷酸等进行流路清洗、添加螯合剂、使用高浓度样品进行掩盖。但是，即使采取此类处理方式，仍难以获得高重现性的分析结果。本文介绍了“无金属流路”的超高效液相色谱仪“Nexera XS inert”系统，以及在不锈钢色谱柱内表面包覆有 PEEK 材料的“无金属色谱柱”，此系统分析核苷酸等具有磷酸基团的化合物时有很好的金属吸附抑制效果。

1. 样品及分析条件

将含磷酸基团的单磷酸腺苷（AMP）、二磷酸腺苷（ADP）和三磷酸腺苷（ATP）作为样品，全部用水溶解、稀释。评价金属吸附的影响，我们比较色谱仪和色谱柱的两个组合方式，一个是含金属的系统，另一个是无金属系统，如表 1 所示。分析条件如表 2 所示。

表 1. 系统结构

	系统	色谱柱
金属流路	Nexera XS	Shim-pack™ Scepter C18-120
无金属流路	Nexera XS inert	Shim-pack Scepter C18-120 [无金属]

表 2. 分析条件

系统	:	Nexera XS inert Nexera XS
色谱柱	:	Shim-pack Scepter C18-120 [无金属] ^{*1} (100 mm×2.1 mm 内径, 3 μm) Shim-pack Scepter C18-120 ^{*2} (100 mm×2.1 mm 内径, 3 μm)
流动相	:	乙腈/10 mmol/L 甲酸铵溶液 = 0.5: 99.5
流速	:	0.2 mL/min
柱温	:	40 °C
样品瓶	:	TORAST™-H 玻璃瓶 (岛津 GLC) ^{*3}
进样体积	:	2 μL
检测波长	:	254 nm (SPD-M40, UHPLC 惰性流通池)

*1 P/N 227-31073-02, *2 P/N 227-31014-05, *3 P/N 370-04350-00

2. 峰形及峰面积重复性的比较

AMP、ADP、ATP 的混合标准溶液 (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 色谱图如图 1、2 所示, 重复分析 10 次混合标准溶液时的 ATP 色谱峰拖尾因子及峰面积变化如图 3、4 所示。金属流路系统中, 由于金属吸附, 导致色谱峰出现拖尾, 拖尾因子大于 4。此外, 相同样品重复分析时, ATP 的峰面积呈增加趋势。而在无金属流路中, 发现峰形得到改善, 拖尾因子约为 1。此外, 与金属流路系统相比, 从第 1 次至第 10 次的峰面积值几乎没有变化, 重现性好。由此可知, 使用无金属流路系统会抑制金属吸附, 可以改善峰形和提高面积重现性。

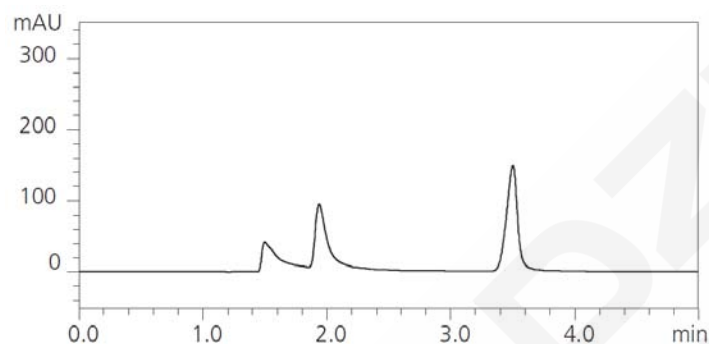


图 1. 金属流路中测定的 AMP、ADP、ATP 混合标准样品色谱图 (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$)

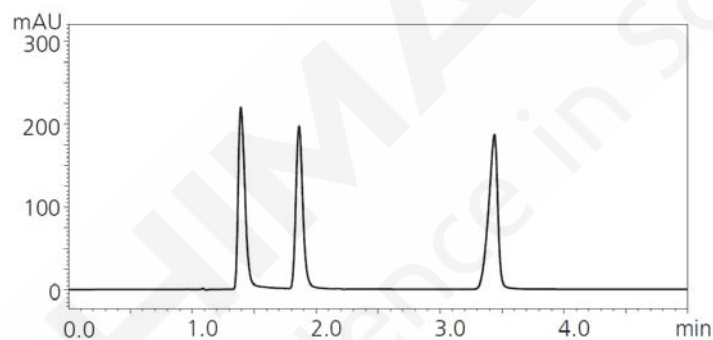


图 2. 无金属流路中测定的 AMP、ADP、ATP 混合标准样品色谱图 (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$)

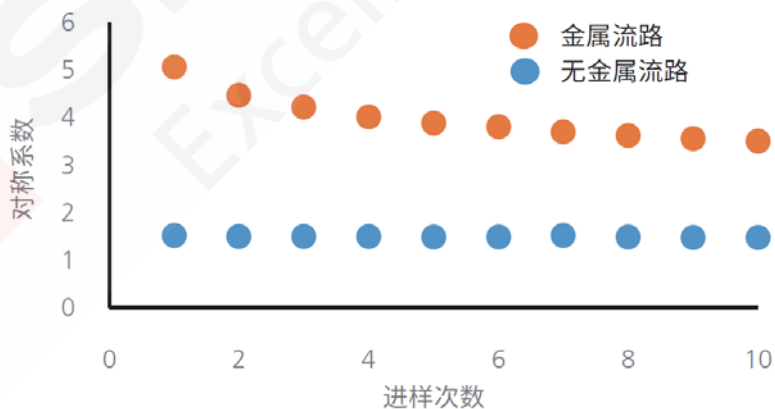


图 3. 不同进样次数的 ATP 拖尾因子

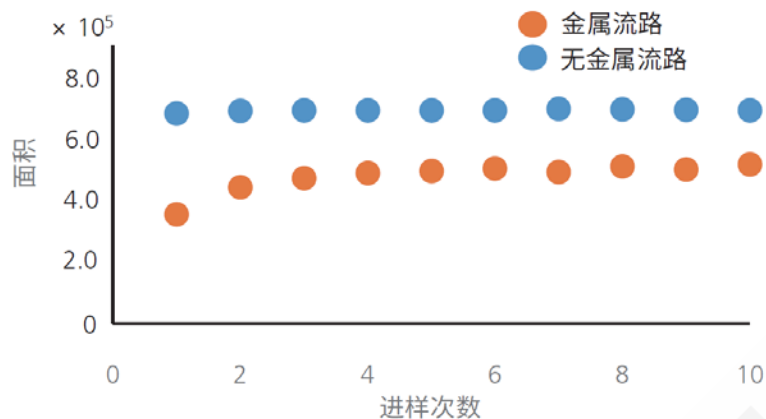


图 4. 不同进样次数的 ATP 峰面积值

3. 分析核苷酸标准样品时的定量精度比较

按照表 2 的条件测定 ATP 标准溶液 (1、2.5、5、10、25、50 $\mu\text{g/mL}$)，制作标准曲线。在金属流路系统中测定所得的标准曲线受金属吸附影响，线性降低，相关系数 $r^2=0.9918$ (图 5)。各校准点的准确度及精密度如表 3 所示。1 $\mu\text{g/mL}$ 未能检测出。此外，在 2.5 $\mu\text{g/mL}$ 时得以检测出，但由于峰强度不足，浓度值的偏差较大。制备了 2、20、45 $\mu\text{g/mL}$ 的样品作为 QC 样品，使用图 5 的标准曲线进行定量。定量结果、定量准确度及精密度如表 4 所示。金属流路中，由于受金属吸附的影响，特别是使用线性较差的低浓度区域标准曲线时，定量值偏差较大。而在非金属流路系统中所得的标准曲线，由于金属吸附抑制效果良好，获得了良好的线性 (相关系数 $r^2=0.9999$) (图 6)。使用非金属流路系统，在相同条件下测定 ATP 标准溶液，各校准点样品的准确度及精密度结果如表 5 所示，QC 样品的定量结果如表 6 所示。与使用金属流路系统时的结果相比，低浓度样品的准确度、精密度均获得良好结果。综合以上结果可知，流路的非金属化对于分析核苷酸等具有磷酸基团的化合物十分有效。

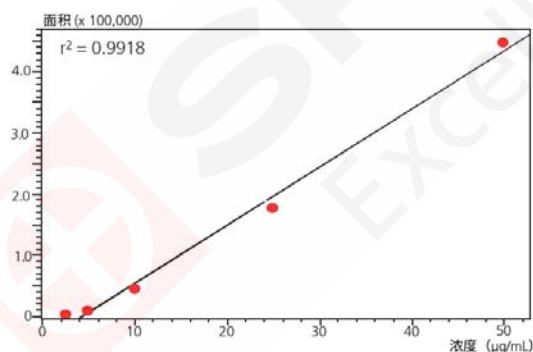


图 5. ATP 的标准曲线 (金属流路)

表 3. 校准点的定量值、准确度及精密度 (金属流路)

浓度($\mu\text{g/mL}$)	定量结果 (n=6)		
	定量值 ($\mu\text{g/mL}$)	准确度 (%)	精密度 ($\mu\text{g/mL}$)
1	N.D.*	---	---
2.5	2.28	91.0	110

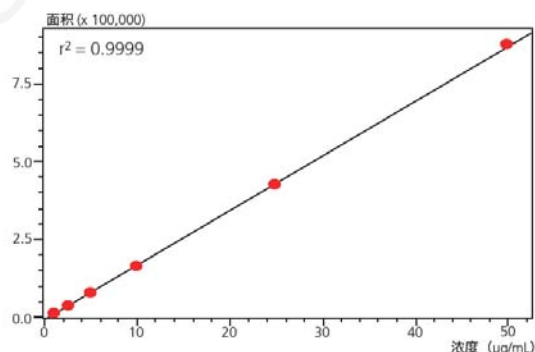


图 6. ATP 的标准曲线 (非金属流路)

表 5. 校准点的定量值、准确度及精密度 (非金属流路)

浓度($\mu\text{g/mL}$)	定量结果 (n=6)		
	测量浓度 ($\mu\text{g/mL}$)	准确度 (%)	精密度 ($\mu\text{g/mL}$)
1	1.07	101	0.61
2.5	2.43	97.0	0.50

5	5.29	106	4.9
10	8.65	86.5	7.1
25	22.7	91.0	6.3
50	51.3	103	3.6

*N.D.: Not Detected

表 4. QC 样品的定量值、准确度及精密度 (金属流路)

浓度(μg/mL)	定量结果 (n = 6)		
	定量值 (μg/mL)	准确度 (%)	精密度 (μg/mL)
2	4.53	226	1.6
20	18.4	91.9	5.7
45	46.4	103	3.3

5	4.82	96.4	0.28
10	9.74	97.4	0.24
25	24.9	99.4	0.81
50	50.6	101	0.095

表 6. QC 样品的定量值、准确度及精密度 (无金属流路)

浓度(μg/mL)	定量结果 (n = 6)		
	定量值 (μg/mL)	准确度 (%)	精密度 (μg/mL)
2	2.00	100	0.59
20	19.6	98.2	0.081
45	44.9	99.7	0.11

4. 结论

本文评价了金属吸附对核苷酸分析的影响。与使用不锈钢材质的系统、色谱柱相比，将流路无金属化，可在分析具有磷酸基团的化合物时，获得准确且重现性良好的结果。以往使用不锈钢材质系统和色谱柱分析具有磷酸基团的化合物时，需要采取抑制金属吸附的处理，而 Nexera XS inert 与 Shim-pack Scepter C18 无金属色谱柱结合使用后，无需进行金属抑制处理，即可实现高灵敏度、高精度分析。

Nexera、Shim-pack 是岛津制作所株式会社在日本及其他国家的商标。

使用生物惰性液相评价 mRNA 疫苗分析方法重复性与残留量

摘要： 本文使用岛津生物惰性液相色谱系统 Nexera XS inert 结合反向离子交换色谱法建立 mRNA 疫苗检测方法。通过对 mRNA 疫苗分析方案重复性与残留量进行考察，验证得出，该方法无需进行吸附饱和与金属抑制，即可获得可靠、稳定的检测结果，极大程度节约样品消耗量、提高检测效率。

关键词： 生物惰性液相 mRNA疫苗 重复性 残留量

mRNA 疫苗是基于靶点或抗原的选择而对 mRNA 进行编码，并通过特定递送系统(如 LNP) 进入细胞质内，在细胞内产生特定的蛋白物质，在细胞内或分泌到细胞外后，刺激免疫系统，产生免疫反应。自 1996 年开展首个 mRNA 肿瘤疫苗应用研究后，mRNA 疫苗的研发随着医药技术的发展而不断深入。2020 年出现新冠疫情，mRNA 疫苗更是被推上生物医药领域的研发热潮。在 mRNA 疫苗的研究中，液相是常用的检测分析手段。由于结构本身含有的磷酸基团，使用常规液相分析，非常容易与金属管路产生吸附，造成重复性差、残留量高、无法准确定量分析等问题。因此，解决吸附现象、获得稳定结果，成为 mRNA 疫苗液相分析中的突破重点。

目前，为应对该项难点，多数实验检测前，使用高浓度 mRNA 疫苗样品连续多针进样，对管路吸附饱和和处理，待峰面积稳定后，再进行正式数据采集；另外，进样针处的残留，还需要额外考察和优化。采用这种常规应对方法，既浪费珍贵的 mRNA 疫苗样品，又耗时，并且进样针的残留控制也并不理想。

岛津生物惰性液相 Nexera XS inert 系统，采用无金属样品流路，在耐高压的同时，具有优异的抗吸附能力。可解决 mRNA 疫苗液相分析中吸附残留等难点，本实验使用该套系统开发 mRNA 疫苗检测分析方法，无需饱和吸附、额外清洗，即可获得稳定、高效、低残留检测结果。

1. 实验部分

1.1 仪器

岛津生物惰性液相 Nexera XS inert 系统，配置信息如下：

系统控制器	: CBM-40A	脱气机	: DGU-405
输液泵	: LC-40D XSi×2	柱温箱	: CTO-40C
自动进样器	: SIL-40C XSi	检测器	: SPD-M40
色谱工作站	: Labsolutions Ver. 5.113		

1.2 分析条件

液相色谱条件

色谱柱	: DNAPac™RP (100 mm x 2.1 mm I.D., 4 μm)
流动相	: A-0.1 mol/L 三乙基乙酸铵: 异丙醇 (900:22.5, v:v) ; B-0.1 mol/L 三乙基乙酸铵: 乙腈: 异丙醇 (600:200:20, v:v:v)
流速	: 0.2 mL/min

柱 温 : 60°C

进 样 体 积 : 10 μ L

洗 脱 方 式 : 梯度洗脱, B 相起始浓度为 29%, 时间程序如表 1 所示。

表 1. 梯度洗脱时间程序

时间(min)	单元	处理命令	值
5.00	泵	B Conc	29
5.10	泵	B Conc	42
18.00	泵	B Conc	42
18.10	泵	B Conc	100
21.00	泵	B Conc	100
21.10	泵	B Conc	29
30.00	控制器	STOP	

2. 样品前处理

移取 mRNA 疫苗供试品 10 μ L, 置 1 mL 离心管中, 加无核酸酶水 490 μ L, 混匀, 待测。

3. 结果与讨论

3.1 mRNA 疫苗典型色谱图

使用上述液相条件, 对某 mRNA 疫苗进行检测分析, 所得色谱图见图 1。

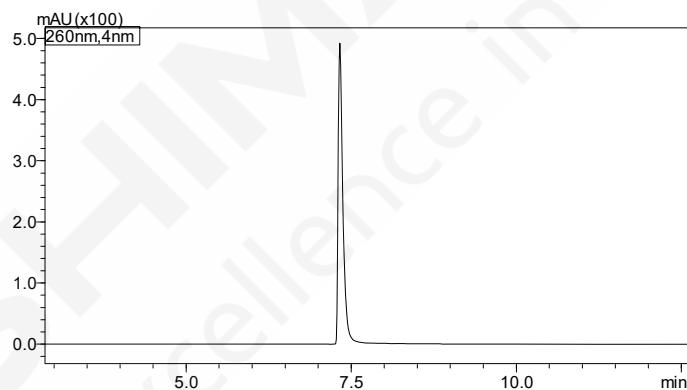


图 1. 某 mRNA 疫苗色谱图 (30 μ g/mL)

3.2 重复性

使用 Nexera XS inert 系统对某 mRNA 疫苗供试品无饱和操作, 直接平行进样六次, 进行重复性考察, 实验结果见表 2。

表 2. 某 mRNA 疫苗 HPLC 重复性分析结果 (n=6)

#	保留时间 (min)	峰高	峰面积
1	7.33	492,149	2,515,237
2	7.32	492,878	2,519,795
3	7.32	496,326	2,510,582
4	7.32	495,672	2,512,371
5	7.31	494,967	2,474,948
6	7.32	508,743	2,560,677
RSD%	0.08	1.22	1.09

3.3 残留考察

分别使用常规液相与生物惰性液相连续分析某 mRNA 疫苗样品 7 针后，再连续分析 3 针空白溶剂，从而评估两套系统某 mRNA 疫苗残留量。实验结果得出，常规液相所得三针溶剂空白残留量依次为 1.16%、0.70%、0.50%；生物惰性液相所得三针溶剂空白残留量依次为 0.69%、0.43%、0.28%，均小于 1%，相比普通液相可获得更低残留量，满足 mRNA 疫苗定量分析需求。由此可见，岛津生物惰性液相系统使用无金属流路系统可抑制金属吸附。

Data	数据文件名	保留时间	面积	分析日期/时间
1	mRNA_1.lcd	9.078	2,456,359	2022/12/15 18:11:46
2	mRNA_2.lcd	9.087	2,452,590	2022/12/15 18:42:19
3	mRNA_3.lcd	9.074	2,472,244	2022/12/15 19:12:53
4	mRNA_4.lcd	9.076	2,476,765	2022/12/15 19:43:26
5	mRNA_5.lcd	9.078	2,483,765	2022/12/15 20:14:00
6	mRNA_6.lcd	9.086	2,507,533	2022/12/15 20:44:34
7	mRNA_7.lcd	9.075	2,522,466	2022/12/15 21:15:07
8	第一针溶剂空白_1	9.077	29,269	2022/12/15 21:45:41
9	第二针溶剂空白_2	9.079	17,542	2022/12/15 22:16:15
10	第三针溶剂空白_3	9.083	12,607	2022/12/15 22:46:49

图 2. 某 mRNA 疫苗残留量考察结果（常规液相）

Data	数据文件名	保留时间	面积	分析日期/时间
1	溶剂空白.lcd	—	—	2022/12/29 13:24:56
2	mRNA-01.lcd	7.327	2,515,237	2022/12/29 13:55:21
3	mRNA-02.lcd	7.320	2,519,795	2022/12/29 14:25:45
4	mRNA-03.lcd	7.319	2,510,582	2022/12/29 14:56:10
5	mRNA-04.lcd	7.319	2,512,371	2022/12/29 15:26:34
6	mRNA-05.lcd	7.309	2,474,948	2022/12/29 15:57:00
7	mRNA-06.lcd	7.317	2,560,677	2022/12/29 16:06:34
8	mRNA-07.lcd	7.317	2,543,999	2022/12/29 16:36:59
9	第一针溶剂空白.lcd	7.320	17,554	2022/12/29 17:07:26
10	第二针溶剂空白.lcd	7.308	10,818	2022/12/29 17:37:51
11	第三针溶剂空白.lcd	7.310	7,204	2022/12/29 18:08:16

图 3. 某 mRNA 疫苗残留量考察结果（生物惰性液相）

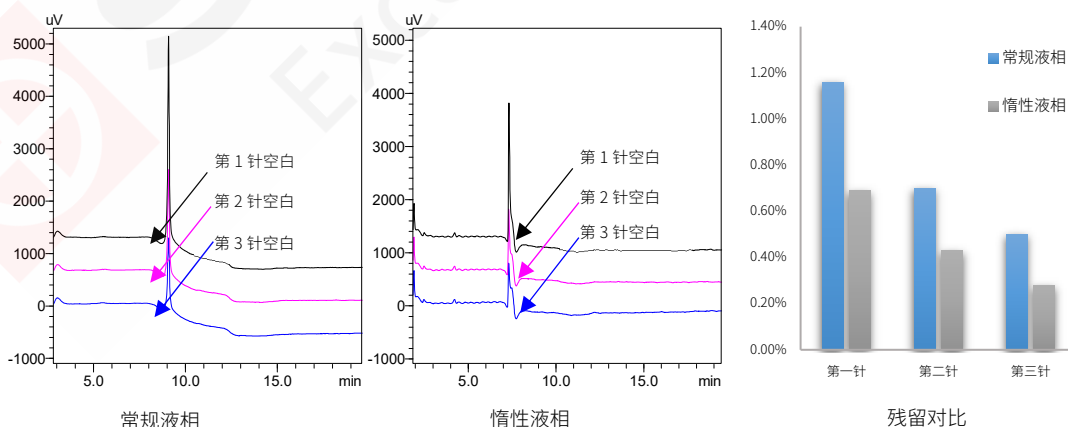


图 4. 某 mRNA 疫苗残留量考察色谱图

4. 结论

实验使用岛津 Nexera XS inert 生物惰性超高效液相建立 mRNA 疫苗样品分析方法。通过考察重复性与残留量可知，该系统在无预饱和处理，直接进样分析后，目标物保留时间、峰面积 RSD% 分别为 0.08%、1.09%；检测完成后，无额外残留处理，三针空白溶剂的残留量分别为 0.69%、0.43%、0.28%。所得结果，满足 mRNA 疫苗重复性与残留量检测需求。



利用 LCMS 对 mRNA 和 DNA 生产用核苷酸原料进行定性分析

摘要：本文采用Nexera XS Inert生物惰性超高效液相色谱和单四极杆质谱LCMS-2050联用仪对mRNA和DNA生产用核苷酸原料NTP和dNTP进行定性分析。NTP和dNTP中含磷酸基团，易与金属产生吸附作用，Nexera XS Inert在保证超高耐压的前提下，管路经peek材料内衬，实现全流路惰性化，抑制金属吸附，使NTP和dNTP的色谱峰型良好。通过优化流动相和质谱采集参数，采用DUIS（ESI+APCI）离子源的负离子模式分析待测样品。结果显示，该方法无需复杂的样品前处理、操作简单，检测的NTP和dNTP色谱峰型良好且均有较好的保留，适用于mRNA和DNA原料进厂质控分析，可对其原料进行快速分子量确认。

关键词：mRNA DNA 原料 NTP dNTP

核苷三磷酸（NTP）是一种含有三个磷酸基团的核苷酸，包括ATP、UTP、CTP、GTP，是mRNA生产过程中体外转录的原料。若将NTP中核糖替换成去氧核糖，那么会使核苷三磷酸变成去氧核苷三磷酸（dNTP），包括dATP、dCTP、dGTP和dTTP。dNTP是合成DNA的原料，常用于PCR、qPCR、RT-PCR、cDNA或普通DNA合成、引物延伸反应、DNA测序、DNA标记等各种常规分子生物学反应。核苷酸原料的检测与分析是mRNA和DNA生产物料质控的重要一环。

NTP和dNTP中含磷酸基团，若使用常规高效液相色谱仪分析，易与系统中不锈钢管路等金属部件产生吸附作用，影响色谱峰峰形，且易产生残留。岛津最新推出Nexera XS Inert生物惰性超高效液相色谱仪，在保证超高耐压的前提下，管路经peek材料内衬，实现全流路惰性化，抑制金属吸附，使NTP和dNTP的色谱峰型良好。

本实验采用Nexera XS Inert生物惰性超高效液相色谱和单四极杆质谱LCMS-2050联用仪对mRNA和DNA生产用核苷酸原料进行定性分析，无需复杂的样品前处理、操作简单、分析速度快，适用于mRNA和DNA原料进厂质控分析，可对其原料进行快速分子量确认。

1. 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

色谱柱：Shim-Pack Scepter C18-120 [Metal free] (50 mm×2.1 mm I.D., 3μm)，岛津（上海）实验器材有限公司，P/N: 227-31073-01)

流动相：A相-10mM DIPEA+25mM HFIP，B相-甲醇

进样体积：5 μL 柱温：40°C

流速：0.3 mL/min 洗针液：甲醇/水=1:1 (v:v)

洗脱方式：梯度洗脱，B相初始浓度为 0%，时间程序见表 1。

表 1. 梯度洗脱程序

Time(min)	Module	Command	Value
0.50	Pumps	Pump B Conc.	0
3	Pumps	Pump B Conc.	30
4	Pumps	Pump B Conc.	30
4.1	Pumps	Pump B Conc.	0
8.00	Control	Stop	

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：200~600

1.3 样品前处理方法

将 NTP 和 dNTP 样品用水溶解，并稀释至 100 μmol/L。

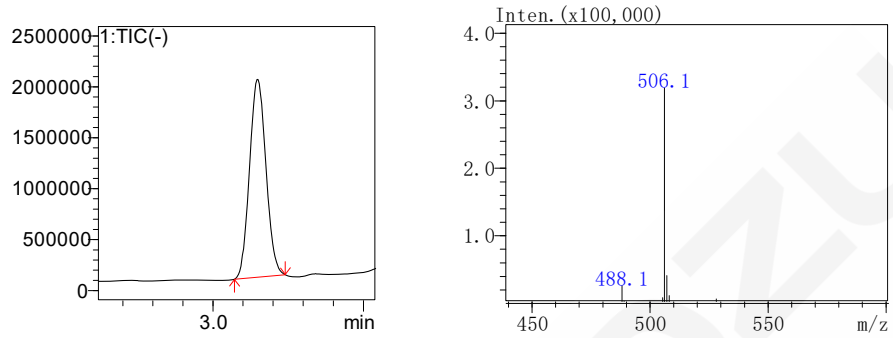
2. 结果与讨论

2.1 mRNA 体外转录原料 NTP 分子量及分析结果

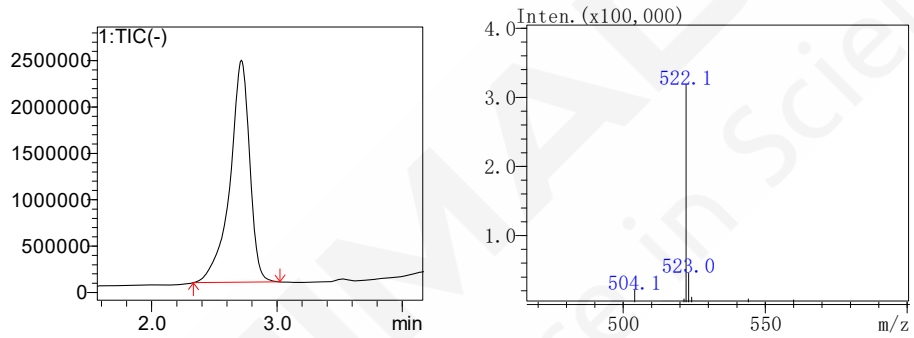
对 mRNA 体外转录原料 ATP、GTP、CTP、UTP 进行检测，总离子流图和质谱图见图 2，核苷酸的分子式、理论分子量、实测分子量见表 2。其中 ATP 检测到 m/z 506.1 峰、GTP 检测到 m/z 522.1 峰、CTP 检测到 m/z 482.1 峰、GTP 检测到 m/z 483.1 峰，均为[M-H]峰。

表 2. NTP 分子式及分子量检测结果

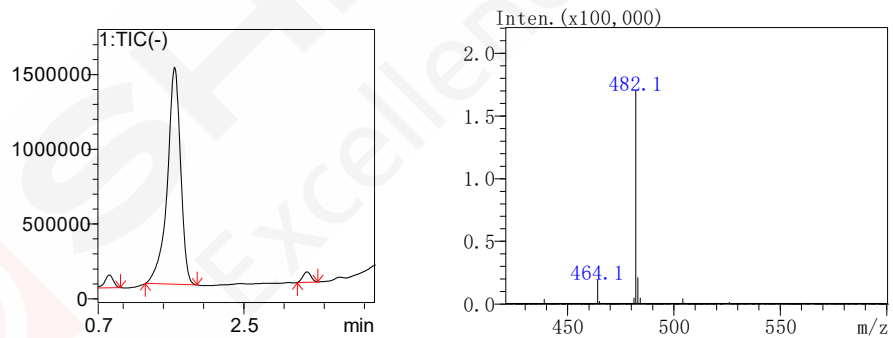
序号	名称	分子式	分子量	实测值
1	ATP	$C_{10}H_{16}N_5O_{13}P_3$	507.0	506.1
2	GTP	$C_{10}H_{16}N_5O_{14}P_3$	523.0	522.1
3	CTP	$C_9H_{16}N_3O_{14}P_3$	483.0	482.1
4	UTP	$C_9H_{15}N_2O_{15}P_3$	484.0	483.1



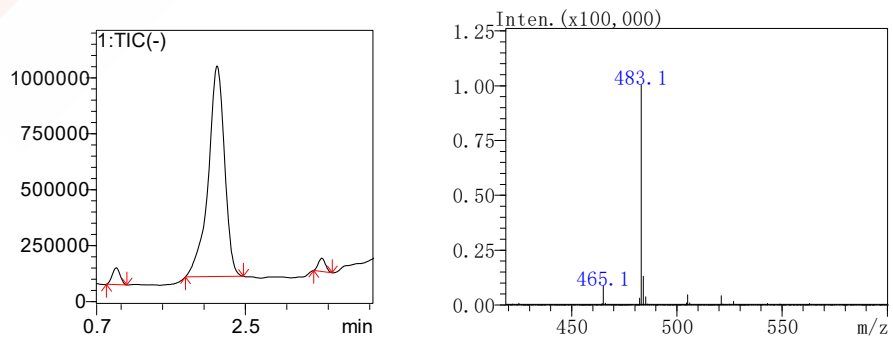
1a. ATP 总离子流色谱图和质谱图



1b. GTP 总离子流色谱图和质谱图



1c. CTP 总离子流色谱图和质谱图



1d. UTP 总离子流色谱图和质谱图

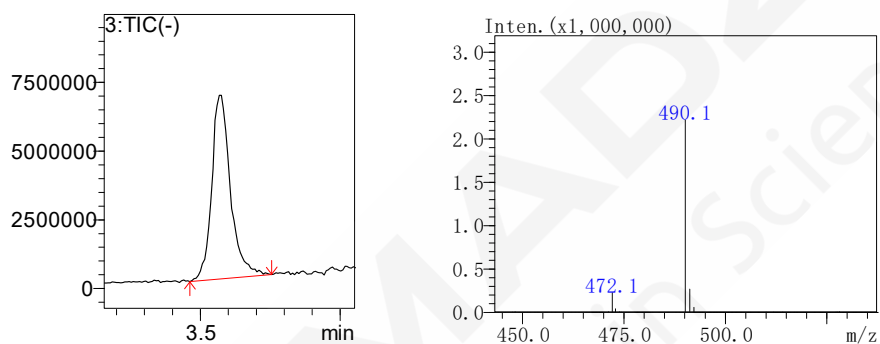
图 2. NTP 总离子流色谱图和质谱图

2.2 聚合酶链式反应生产 DNA 药物原料 dNTP 分子量及分析结果

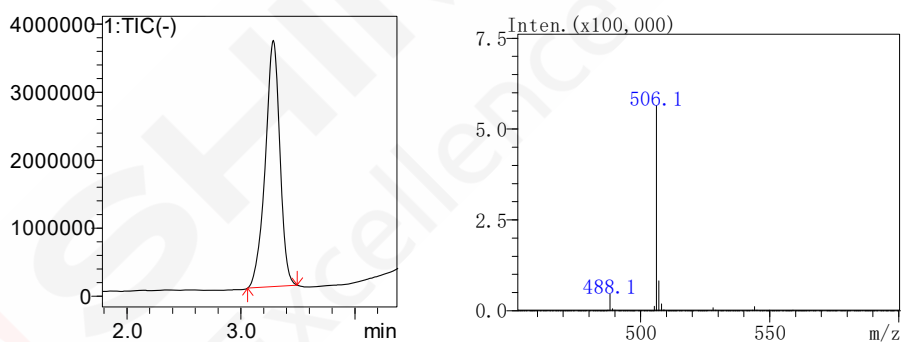
对聚合酶链式反应生产 DNA 药物原料 dATP、dGTP、dCTP、dTTP 进行检测，总离子流图和质谱图见图 3，脱氧核苷酸的分子式、理论分子量、实测分子量见表 3。其中 dATP 检测到 m/z 490.1 峰、dGTP 检测到 m/z 506.1 峰、dCTP 检测到 m/z 466.1 峰、dGTP 检测到 m/z 481.1 峰，均为[M-H]⁻峰。

表 3. dNTP 分子式及分子量检测结果

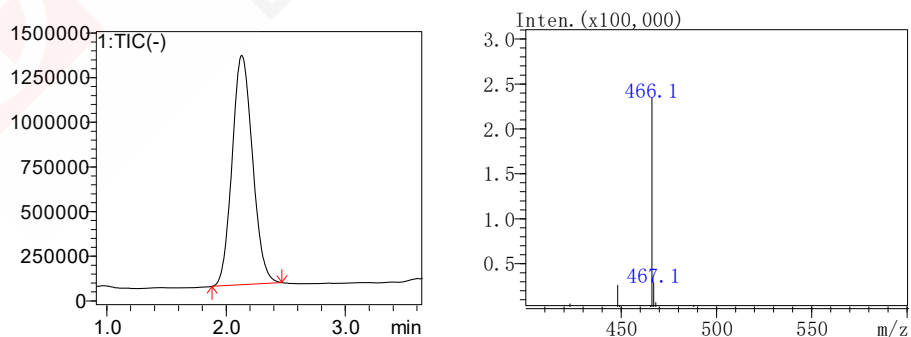
序号	名称	分子式	分子量	实测值
1	dATP	C ₁₀ H ₁₆ N ₅ O ₁₂ P ₃	491.0	490.1
2	dGTP	C ₁₀ H ₁₆ N ₅ O ₁₃ P ₃	507.0	506.1
3	dCTP	C ₉ H ₁₆ N ₃ O ₁₃ P ₃	467.0	467.1
4	dTTP	C ₁₀ H ₁₇ N ₂ O ₁₄ P ₃	482.0	482.1



2a. dATP 总离子流色谱图和质谱图



2b. dGTP 总离子流色谱图和质谱图



2c. dCTP 总离子流色谱图和质谱图

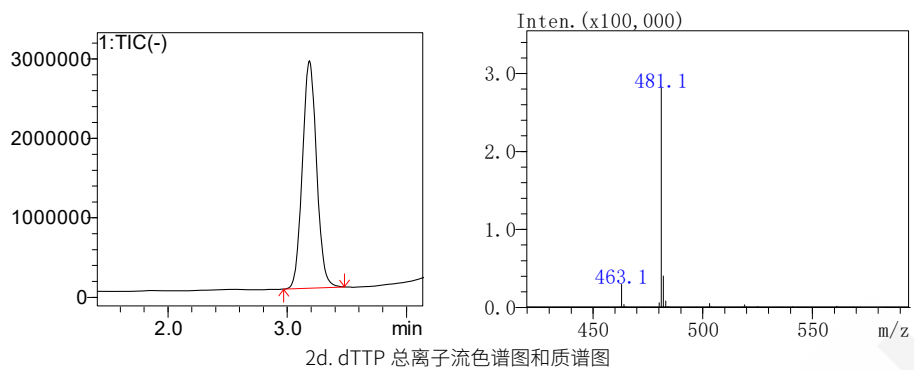


图 3. dNTP 总离子流色谱图和质谱图

3. 结论

本文采用Nexera XS Inert生物惰性超高效液相色谱和单四极杆质谱LCMS-2050联用仪对mRNA和DNA生产用核苷酸原料进行定性分析，利用液相色谱进行分离，单四极杆质谱检测原料的分子量。该方法无需复杂的样品前处理、操作简单、分析速度快，可分离出原料中杂质，结果可靠，适用于mRNA和DNA原料进厂质控分析，可对其原料进行快速分子量确认。

2.2 蛋白类药物

蛋白类药物是以 20 种天然氨基酸为基本结构单元依序连接而得，分为多肽和基因工程药物、单克隆抗体和基因工程抗体、重组疫苗等。与传统小分子药物相比，蛋白类药物具有药理活性强、特异性高、毒性低、生物功能明确等优点。近年来，随着生物技术药物的发展，蛋白类药物，尤其是重组蛋白、抗体等发展迅速，已成为药物研发中具有广泛应用前景的生物大分子，在疾病的预防和治疗中的地位日趋重要。

药品的质量源于设计，严格的质量控制是确保药物安全有效的关键节点，蛋白类药物也不例外。针对蛋白类药物质量控制，中国国家药品监督管理局先后出台“中国药典”、“人用单克隆抗体质量控制技术指导原则”、“生物类似药研发和评价技术技术指导原则”等相关法规和技术指南。参照要求，对于蛋白类药物，其质量控制要点主要包括蛋白纯度检查、蛋白质含量测定、分子量测定、等电点测定、肽图分析、氨基酸组成分析、二硫键分析、聚集体测定等。其中，液相色谱法是质量评价分析的有力工具，常用的主要有三种，分别为反向高效液相色谱（RP-HPLC）、离子交换色谱（IEC）、分子排阻色谱（SEC）。使用液相色谱法分析时，由于组成蛋白类药物氨基酸性质的差异性，尤其是酸性氨基酸（Glu、Asp）具有羧基，常会出现因金属吸附问题导致的样品损失、响应降低等检测问题。解决蛋白类药物金属吸附问题，则成为获得药物准确分析的前提基础。为此，岛津推出 Nexera XS inert 生物惰性系统，应对蛋白类药物吸附问题。该系统采用完全惰性的样品流路，确保没有润湿金属表面的吸附作用，可为蛋白类药物检测分析提供理想的解决方案。

本章对岛津生物惰性液相 Nexera XS inert 在蛋白类药物聚集体、分子量等方面的应用案例进行介绍，供分析人员参考。

生物惰性液相结合尺寸排阻色谱法分析多肽药物中共价结合二聚体和非共价结合二聚体杂质

摘要：本文采用岛津生物惰性液相系统结合尺寸排阻色谱法，开发了一种检测多肽药物中共价结合二聚体和非共价结合二聚体杂质的新方法。优选的洗脱液和 SEC 色谱柱可以实现多肽主成分、共价结合二聚体和非共价结合二聚体的有效分离，分离度大于 1.5。连续六次进样，三个目标峰保留时间和峰面积的相对标准偏差（RSD）分别在 0.024~0.025%和 0.048~0.130%之间，重复性良好。多肽药物强制性降解实验样品中检出非共价结合二聚体，峰面积百分比为 6.934%。

关键词：生物惰性液相 尺寸排阻色谱法 多肽药物 共价结合聚集体 非共价结合聚集体

多肽药物在受到加热、冷冻、搅拌等外力作用时可能发生结构改变，产生聚集体。多肽聚集现象可能会降低药物活性，改变半衰期及增加免疫原性。多肽药物中聚集体杂质的分析是多肽药物开发过程中备受关注的环节，意义重大。

多肽药物中的聚集体有可能是通过二硫键、酯或酰胺键等化学键连接而形成的共价结合聚集体，也可能是通过氢键、疏水相互作用或静电引力等非特异性相互作用形成的非共价结合聚集体。其中共价结合聚集体结构相对稳定，研究得较多；非共价结合的聚集体分析难度更大，研究得较少，因为非特异性相互作用力很弱，容易受到聚集体与尺寸排阻色谱柱间存在的相互作用力影响，而导致聚集体状态发生改变。

本文采用生物惰性液相系统结合尺寸排阻色谱法，开发了一种检测多肽药物中共价结合二聚体和非共价结合二聚体的新方法，方法分离度好、稳定可靠，供相关检测人员参考。

1. 实验部分

1.1 仪器

本实验使用岛津生物惰性超高效液相色谱系统 Nexera XS inert。具体配置为：

系统控制器	: CBM-40lite	脱气机	: DGU-405
输液泵	: LC-40D XSi	自动进样器	: SIL-40C XSi
柱温箱	: CTO-40C	检测器	: SPD-M40
色谱工作站	: LabSolutions Ver. 5.111		

1.2 分析条件

液相色谱条件

色谱柱	: SHIMSEN Ankylo SEC-120 (300 × 7.8 mm I.D., 3.0 μm)		
	岛津（上海）实验器材有限公司， P/N: 380-01215-41		
洗脱液	: 100 mM 硫酸铵水溶液（含 20%乙腈和 0.1%TFA）		
洗脱方式	: 等度洗脱	流速	: 0.5 mL/min
洗脱时间	: 35 min	进样体积	: 20 μL

柱 温 : 35°C

检测波长 : 220 nm

1.3 样品前处理

共价结合二聚体、非共价结合二聚体、多肽药物非破坏样品和通过强制降解实验得到的破坏样品，使用洗脱液适当稀释后上机分析。

2. 结果与讨论

2.1 分离度评价

使用优选的洗脱液和色谱柱组合，按照 1.2 分析条件，通过非破坏多肽药物样品中添加共价结合二聚体和非共价结合的二聚体，以评价分离度。色谱图和分离结果分别见图 1 和表 1，三个目标峰分离度大于 1.5，分离良好。

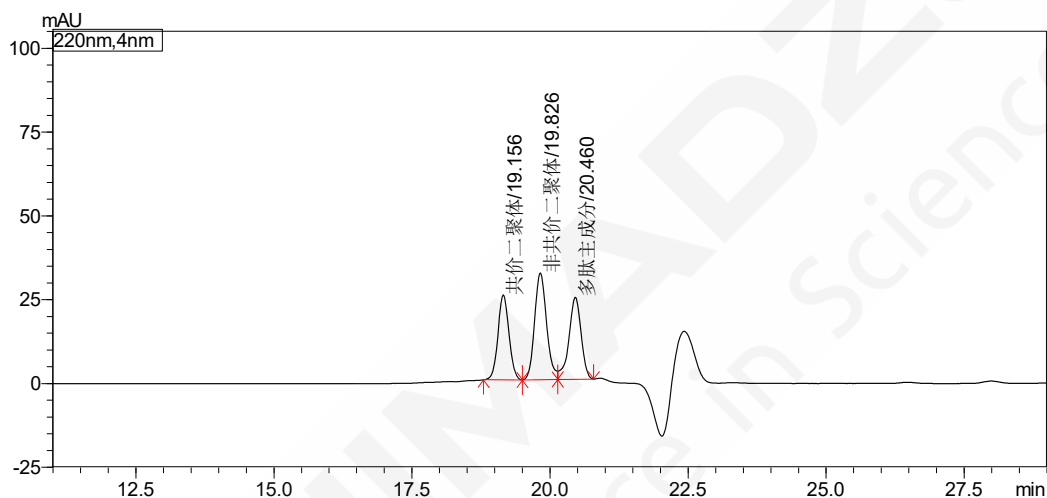


图 1. 多肽主成分、非共价结合二聚体和共价结合二聚体的分离色谱图

表 1. 分离度结果

#	目标物名称	保留时间 (min)	分离度 (USP)
1	共价结合二聚体	19.150	-
2	非共价结合二聚体	19.820	1.710
3	多肽主成分	20.456	1.560

2.2 重复性考察

以“2.1 分离度评价”用样品，重复进样 6 次，考察重复性。6 次重复进样重叠色谱图见图 2。三个目标峰保留时间和峰面积的相对标准偏差 (RSD) 分别在 0.024~0.025 %和 0.048~0.130 %之间，重复性良好。

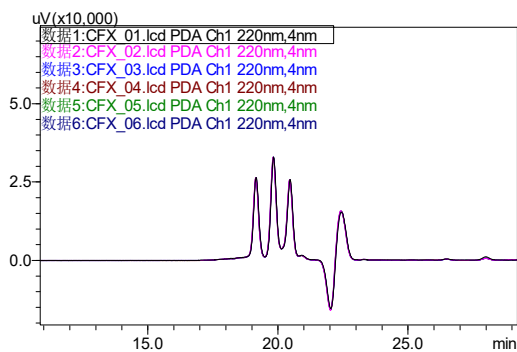


图 2. 重叠色谱图 (n=6)

表 2. 重复性结果 (n=6)

目标物名称	保留时间 (RSD%)	峰面积 (RSD%)
共价结合二聚体	0.025	0.130
非共价结合二聚体	0.024	0.048
多肽主成分	0.024	0.126

2.3 破坏样品分析结果

破坏样品色谱图和分析结果如图3和表3所示。样品中检测到非共价结合二聚体杂质，峰面积百分比为6.934%，未检测到共价结合二聚体。

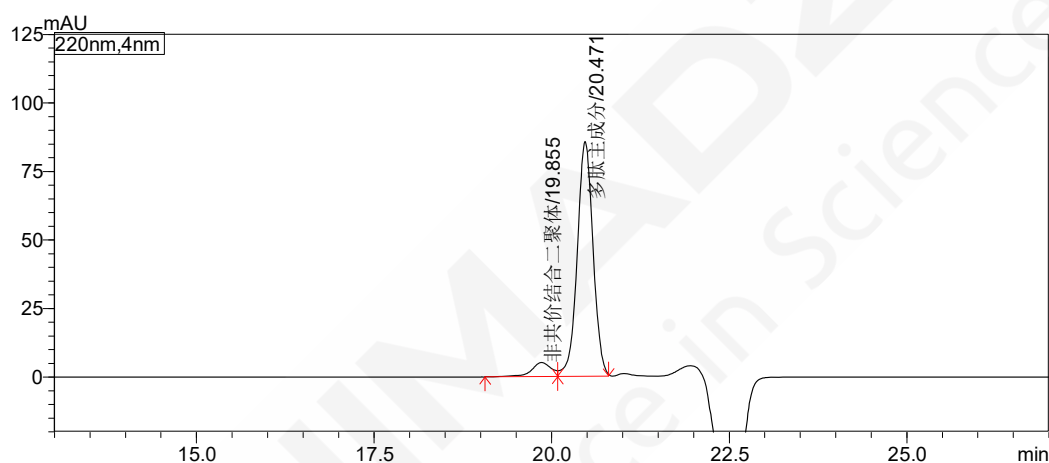


图 3. 破坏样品色谱图

表 3. 破坏样品分析结果

名称	保留时间	峰面积	峰面积%
非共价结合二聚体	19.855	98529	6.934
多肽主成分	20.471	1322445	93.066

3. 结论

使用岛津生物惰性液相色谱系统结合尺寸排阻色谱,建立了多肽药物中非共价结合二聚体和共价结合二聚体杂质检测的新方法。生物惰性液相系统可耐受高盐洗脱液,优选的岛津尺寸排阻色谱柱 SHIMSEN Ankylo SEC-120 和洗脱液组成可最大程度地减少聚集体杂质和色谱柱之间的非特异性作用,获得良好的分离和分析稳定性。本方法分离度好、重复性好,适用于多肽药物中非共价结合二聚体和共价结合二聚体杂质含量测定和评估。

使用生物惰性超高效液相色谱仪分析抗体药物

摘要： 本文使用超高效液相色谱仪“Nexera XS inert”对 mAb 及 ADC 进行质量控制。该系统通过抑制抗体药物与固定相之间的相互作用，可实现高重现性的数据采集。此外，使用含有高浓度腐蚀性盐的流动相进行分析时，该系统也可获得高度稳定的数据。

关键词： 生物惰性超高效液相色谱仪 抗体 质量控制

生物技术药物正在利用基因组编辑和细胞融合等生物技术进行开发。近年来，由于有望有效治疗各种疾病，包括难治性疾病，其中一些药物已在世界范围内推广使用。众所周知，抗体药物，如单克隆抗体（mAb）和抗体偶联药物（ADC），由于其对靶向物质的特异性和亲和力，已知具有良好的治疗效果并可减少不良反应。然而，由于这些生物技术药物是使用动物细胞制造而成，确保药物结构的均一性，是要面临的挑战，这是化学合成小分子药物不曾遇到的。因此，生物技术药物在每个生产工艺中都需要合理的质量控制。例如，ICH-Q6B1,2) 提出了生物制品的规范和测试规程，规定在生产过程中产品有关物质应进行分离和/或确定其百分含量。多数情况下，这些检测均使用液相色谱法进行分析（图 1）。

本文介绍了使用对高浓度盐流动相具有超高耐腐蚀性的惰性 UHPLC 系统“Nexera XS inert”，对 mAb 及 ADC 质量控制的分析案例。由于杂质的种类和含量取决于抗体的类型。因此，优化各样品的分析条件非常重要，并值得关注。本文也会介绍优化技术，敬请参考。

表 1 列出了 TSKgel®系列（东曹株式会社）色谱柱类型、检测项目、分析目的和色谱方法。本文为每项分析均选用了合适的色谱柱类型进行分析。

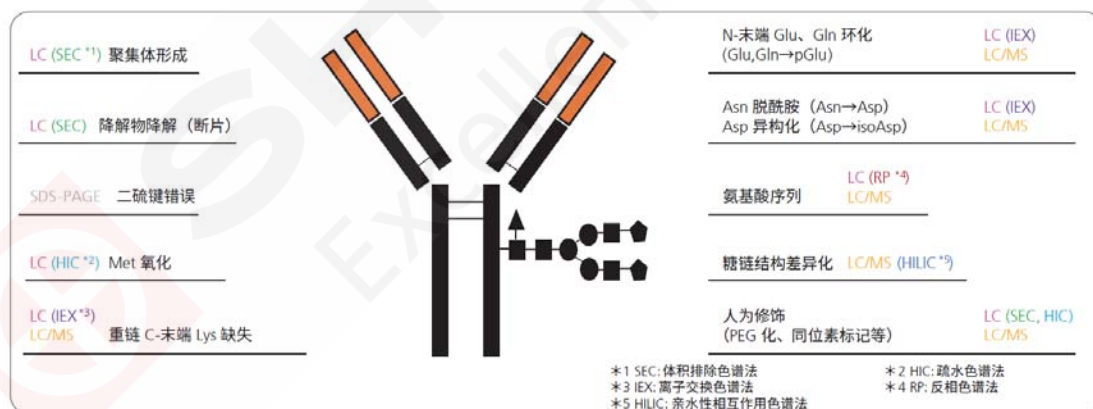


图 1. 抗体药物杂质及分析方法

表 1. 抗体药物杂质分析的色谱方法及色谱柱

项目	目的	色谱方法	色谱柱
聚集体	测定聚集体和降解产物的含量	体积排除色谱法	TSKgel UP-SW3000 TSKgel UP-SW2000 TSKgel SuperSW mAb TSKgel UltraSW Aggregate TSKgel G3000 SWXL

			TSKgel G2000 SWXL TSKgel SuperSW3000 TSKgel Super SW2000
异构体	测定电荷异构体含量	离子交换色谱法	TSKgel CM-STAT® TSKgel SP-STAT® TSKgel Q-STAT®
抗体药物偶联物	测定异构体含量 计算药物抗体偶联比	疏水色谱法	TSKgel Butyl-NPR® TSKgel Phenyl-5PW
结构	评价分子结构或原料药的特异性	反相色谱法	TSKgel Protein C4-300
糖链结构	评价糖链结构的一致性	亲水性相互作用色谱法	TSKgel Amide-80
效价	测定生物活性	亲和色谱法	TSKgel ProteinA-5PW TSKgel Boronate-5PW TSKgel FcR-IIIa-NPR TSKgel FcR-IIIa-5PW

1. 使用体积排除色谱法 (SEC) 分析 mAb、ADC 杂质

mAb 和 ADC 杂质 (如聚集体和降解物) 是影响药物疗效、不良反应、药物稳定性的重要因素³⁾。通常使用 SEC 对此进行评价。此次聚集体分析, 是使用 mAb 标准品 (市售) 和含有相同 mAb 偶联小分子化合物的 ADC 标准品 (市售)。分析条件见表 2、3。在 mAb 分析中, 5 分钟内完成了多聚体、单体及降解产物的色谱分离, 如图 2 所示。在 ADC 的聚集体评价中, 固定相与 ADC 之间疏水性相互作用, 常会导致色谱峰展宽, 从而无法准确进行聚集体评价 (图 3A)。因此, 为了抑制样品与固定相之间的疏水性作用, 流动相中添加了 15% 的异丙醇⁴⁾。结果表明, 分离效果良好 (图 3B)。

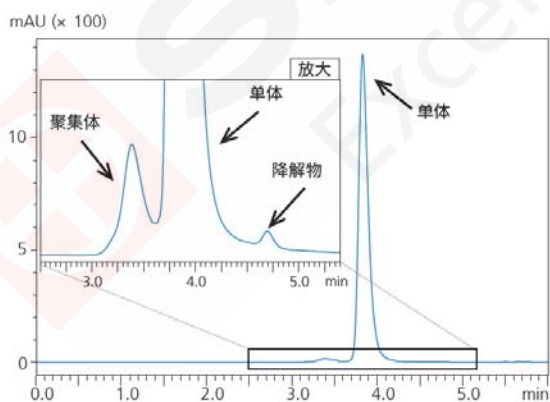


图 2. mAb 聚集体分析的色谱图

表 2. mAb 杂质分析条件 (图 2)

系统	: Nexera XS inert
色谱柱	: TSKgel UP-SW3000 (150 mm × 4.6 mm I.D., 2 μm)
保护柱	: TSKgel 保护柱 UP-SW DC

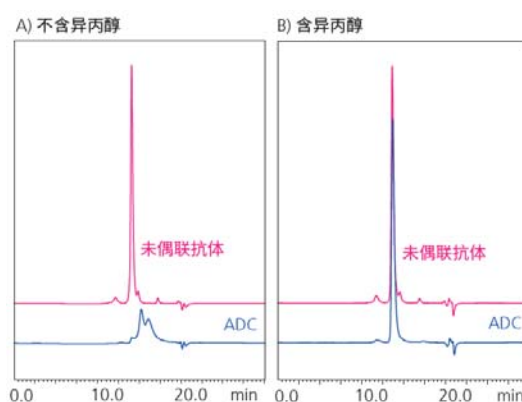


图 3. mAb 及 ADC 色谱图

表 3. mAb 及 ADC 分析条件 (图 3)

系统	: Nexera XS inert
色谱柱	: TSKgel UP-SW3000 (300 mm × 4.6 mm I.D., 2 μm)
保护柱	: TSKgel 保护柱 UP-SW DC

等度洗脱	等度洗脱
流动相 : 含100 mmol/L Na ₂ SO ₄ 的100 mmol/L磷酸钠缓冲液 (pH 7.0)	流动相A : 含250 mmol/L KCl的200 mmol/L磷酸钾 (pH 7.0)
	流动相B : 含250 mmol/L KCl的200 mmol/L磷酸钾 (pH 7.0) /异丙醇= 85:15
流速 : 0.4 mL/min	流速 : 0.2 mL/min
柱温 : 25 °C	柱温 : 25 °C
样品瓶 : TORAST™-H玻璃瓶 ^{*5}	样品瓶 : TORAST-H玻璃瓶 ^{*5}
进样量 : 5 μL	进样量 : 5 μL
样品 : NIST mAb (10 mg/mL)	样品 : 未偶联抗体 (0.5 mg/mL) , ADC (5 mg/mL)
检测 : 280 nm (SPD-M40, UHPLC惰性流通池)	检测 : 280 nm (SPD-M40, UHPLC惰性流通池)
*5: 370-04301-01	*5: 370-04301-01

2. 使用离子交换色谱法 (IEX) 分析电荷异构体 (电荷变异体)

由于 mAb 结构复杂并具有不均匀性, 因此该类药物中会存在电荷异构体与电荷变异体 (3)。电荷差异会对单抗药物稳定性和有效性产生影响, 因此必须对电荷变异体进行准确评价。根据电荷强度的不同, IEX 可分离 mAb 电荷变异体。按照表 4 所示条件, 此次实验对 3 种 mAb 进行电荷变异体评估。在每个样品中, 均成功检测到多种电荷变异的多个色谱峰 (图 4)。

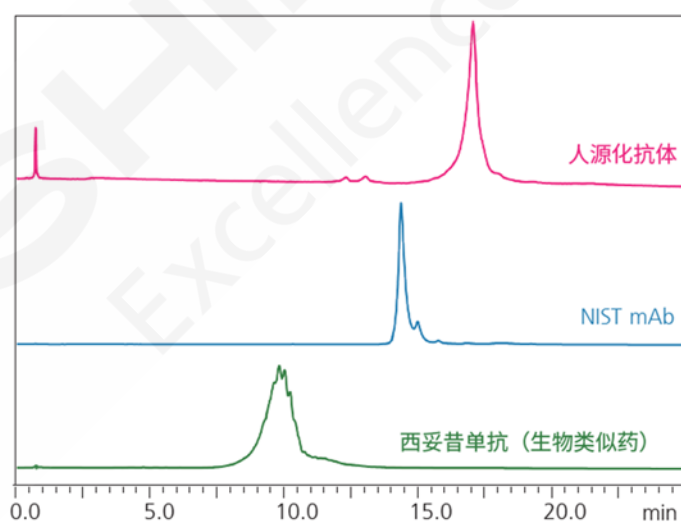


图 4.3 种 mAb 的色谱图

表 4 mAb 的电荷变异体分析条件 (图 4)

系统	: Nexera XS inert
色谱柱	: TSKgel CM-STAT (100 mm × 4.6 mm I.D., 7 μm)
梯度模式	: 0 – 55% B (0 – 30 min)
流动相A	: 20 mmol/L 2-吗啉乙磺酸 (pH 6.0)

流动相B	: 含500 mmol/L NaCl的流动相A
流速	: 0.8 mL/min
柱温	: 25 °C
样品瓶	: TORAST -H玻璃瓶 ⁵
进样量	: 5 μL
样品	: 人源化抗体 (1 mg/mL)、NIST mAb (5 mg/mL)、 西妥昔单抗 (生物仿制药 5 mg/mL)
检测	: 280 nm (SPD-M40, UHPLC 惰性流通池)

3. 利用疏水色谱法 (HIC) 分析 ADC 的药物抗体偶联比

ADC 中偶联小分子的异质性会影响 ADC 药物疗效。本文将介绍使用 HIC 进行单抗异构体和 ADC 异质性的分析方法。

在未经过前处理的情况下,对一种市售 ADC 模拟物进行分析,并按照表 5 所示的条件,评价药物抗体偶联比 (DAR)。最终成功分离小分子药物结合数为 0~6 的不同 ADC (图 5)。

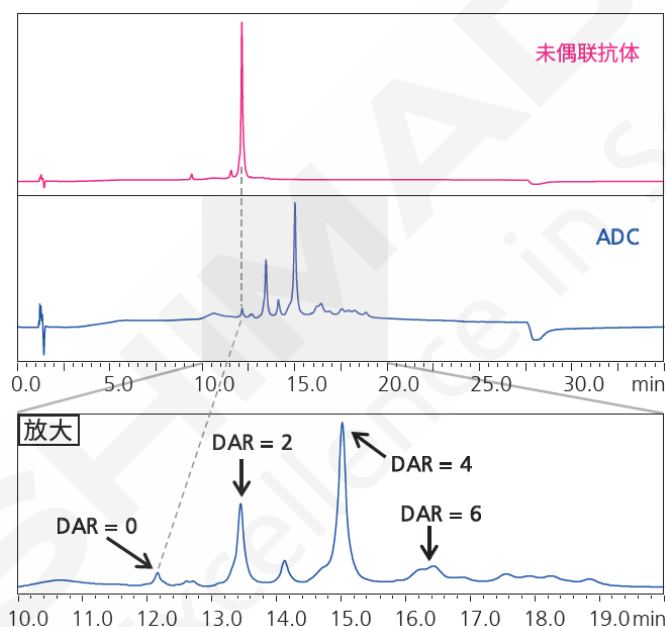


图 5. DAR 分析结果

表 5. DAR 分析条件 (图 5)

系统	: Nexera XS inert
色谱柱	: TSKgel Butyl-NPR (100 mm × 4.6 mm I.D., 2.5 μm)
梯度模式	: 0 – 100% B (0 – 20 min)
流动相A	: 含 1.5 mol/L 硫酸钠的 25 mmol/L 磷酸钠缓冲液 (pH 7.0)
流动相B	: 25 mmol/L 磷酸钠缓冲液 (pH 7.0) / 异丙醇= 80:20
流速	: 0.5 mL/min
柱温	: 35 °C
样品瓶	: TORAST-H玻璃瓶 ⁵
进样量	: 10 μL
样品	: 未偶联 mAb (0.5 mg/mL), ADC (5 mg/mL)
检测	: 280 nm (SPD-M40, UHPLC 惰性流通池)

⁵: 370-04301-01

4. 结论

本文介绍了有关抗体药物、抗体偶联药物质量控制的各种分析案例和分析条件优化技术。体积排除色谱法，可迅速且良好地分离 mAb。对 ADC 的分析，SEC 通过抑制 ADC 与固定相间的疏水性相互作用，同样分离情况良好。离子交换色谱法，利用电荷强度差异，完成了酸性和碱性电荷变异体的分离。疏水色谱法，基于小分子化合物结合数的不同，实现半胱氨酸连接 ADC 的分离。

在抗体药物分析或任何使用含高浓度腐蚀性盐的流动相的分析中，Nexera XS 耐腐蚀性能表现优异，提供了高度稳定的实验数据。



使用尺寸排阻色谱法分析蛋白类药物的聚集体

摘要： 本文使用岛津超高效液相色谱仪“Nexera XS inert”结合尺寸排阻色谱柱“Shim-pack™ Bio Diol”分析 mAb 和 ADC 聚集体。该系统通过抑制色谱柱填料与样品间的静电作用和疏水性作用，提高单克隆抗体和抗体偶联药物与其聚集体和片段的分离。此外，即使用高浓度盐流动相进行分析，该系统也可获得高重现性的数据。

关键词： 生物惰性超高效液相色谱仪 蛋白类药物 聚集体

蛋白质因生产和储存过程中的温度、pH、浓度等的变化，易发生聚集。单克隆抗体 (mAb) 和抗体偶联药物 (ADC) 等蛋白质类药物的聚集，会影响药物的安全性和有效性¹⁾。因此要监测生产和储存过程中所产生的聚集体。常用的监测方法是使用尺寸排阻色谱法 (SEC)，按照组分分子体积由大到小的顺序洗脱的分离模式。但众所周知，mAb 与填料之间的静电作用，ADC 与色谱柱填料之间的疏水性作用会产生吸附，难以将单体与聚集体和片段进行分离^{2), 3)}。为确保数据采集的可靠性，需要考虑这些次要的相互作用。本文介绍了使用岛津尺寸排阻色谱柱“Shim-pack™ Bio Diol”，分析 mAb 和 ADC 聚集体的案例。使用“Nexera XS inert”系统，该系统对高浓度盐的流动相具有耐腐蚀性，可抑制管道内样品的吸附。

1. 试剂及分析条件

称量市售的 1 mg mAb、0.5 mg ADC，分别加入 1 mL、0.5 mL 超纯水，配制为 1 mg/mL 溶液供分析。mAb 和 ADC 的分析条件分别如表 1 和表 2 所示。通过向流动相中添加盐，可抑制导致 mAb 分析中发生吸附的静电作用³⁾。比较了在 100 mmol/L 磷酸缓冲液流动相中添加 150 mmol/L 氯化钠和未添加氯化钠的分析结果。此外，为抑制疏水性作用，通常采用乙醇和乙腈等有机溶剂作为流动相^{2), 3)}。另一方面，SEC 色谱柱一般耐压较低，因此本文采用粘度较低的乙腈作为流动相，通过改变 100 mmol/L 磷酸缓冲液流动相的添加量，研究了 ADC 的分离条件。

表 1. mAb 的分析条件		表 2. ADC 的分析条件	
系统	: Nexera XS inert	系统	: Nexera XS inert
色谱柱	: Shim-pack Bio Diol-300 ^{*1} (150 mm × 4.6 mm 内径, 2 μm)	色谱柱	: Shim-pack Bio Diol-300 (150 mm × 4.6 mm 内径, 2 μm)
流动相	: 含或不含 150 mmol/L 氯化钠的 100 mmol/L 磷酸钠缓冲液 (pH 6.9)	流动相	: 0、5、10、15% 乙腈的 100 mmol/L 磷酸钠缓冲液 (pH 6.9)
流速	: 0.2 mL/min	流速	: 0.2 mL/min
柱温	: 25 °C	柱温	: 25 °C
样品瓶	: TORAST™-H 玻璃瓶 (岛津 SGLC) ^{*2}	样品瓶	: TORAST-H 玻璃瓶 (岛津 SGLC)
进样体积	: 5 μL (1 mg/mL mAb)	进样量	: 5 μL (1 mg/mL ADC)
检测器	: 280 nm (SPD-M40, UHPLC 惰性流通池)	检测器	: 280 nm (SPD-M40, UHPLC 惰性流通池)

*1: P/N 227 -31010-01、*2: P/N 370 -04301-01

2. mAb 的聚集体分析

图 1 所示为使用未添加及添加 150 mmol/L 氯化钠的流动相时的色谱图。同时还包括单体色谱峰附近 (5.5~8.7 分钟) 洗脱的聚集体 (图 1 中-1)、片段 (图 1 中-3) 的色谱峰图。流动相中未添加氯化钠时, 单体的色谱峰 (图 1 中-2) 出现拖尾, 而流动相中添加 150 mmol/L 氯化钠时, 拖尾得到抑制。与此同时, 聚集体和片段的色谱峰分离也得到改善。由此可知, 添加氯化钠后, 色谱柱填料与 mAb 间的静电作用得到抑制, 提高了分离效果。

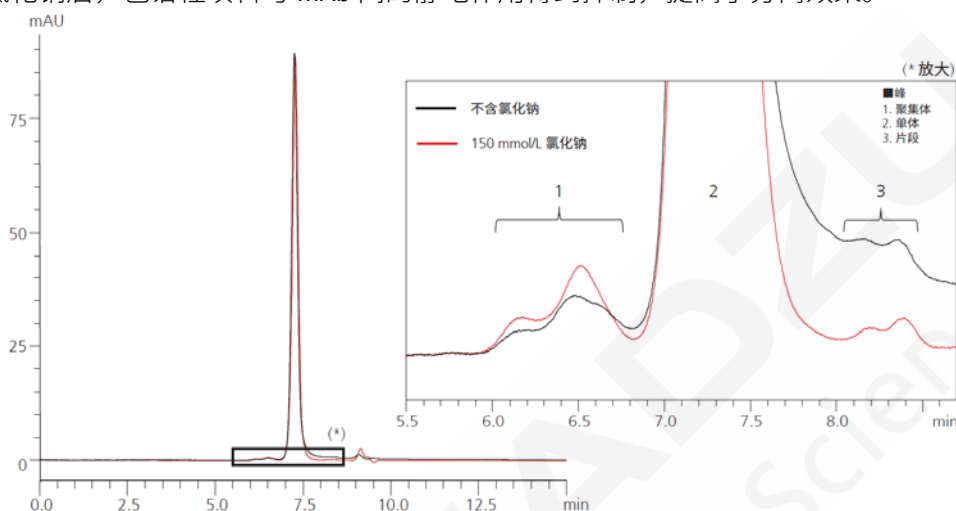


图 1. 流动相中添加/未添加氯化钠时 mAb 的色谱图比较

3. ADC 的聚集体分析

进行 ADC 聚集体分析时, 考察了流动相中乙腈浓度的影响。如图 2 放大图所示, 未添加乙腈时, 单体的色谱峰出现展宽且拖尾。而添加乙腈时, 随着加标浓度的升高, 色谱峰形状得到改善。由此可知, 添加乙腈对 ADC 与色谱柱填料间的疏水性作用具有抑制效果。ADC 与填料间疏水性作用的程度因与抗体结合的低分子药物疏水性程度和结合数而有所不同, 因此需要根据 ADC 的种类, 研究最佳的有机溶剂浓度。但是, 需要注意的是添加过多的有机溶剂可能引起样品变性。

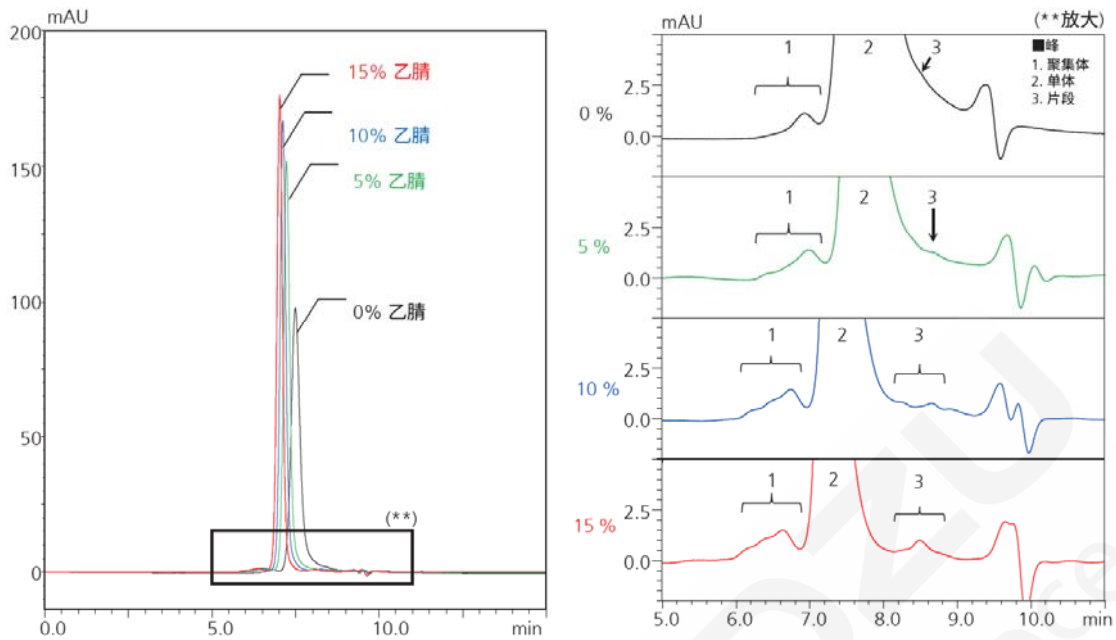


图 2. 流动相中乙腈浓度对分离的影响

4. 结论

本文介绍了使用 Nexera XS inert 系统，采用 Shim-pack Bio Diol 色谱柱分析单克隆抗体 (mAb) 及抗体偶联药物 (ADC) 聚集体的案例。进行这些分析时，由于盐浓度和有机溶剂的浓度对分离有较大影响，因此需要研究合适的流动相种类和浓度，避免样品和填料之间产生次要的相互作用。

虽然包含高浓度盐的流动相、以及在缓冲液中加入有机溶剂的流动相具有提高分离的效果，但是对于普通的 HPLC 系统来说，条件过于苛刻。此次使用具有优异的耐腐蚀性的 Nexera XS inert 系统，以最佳流动相条件完美地完成了分析，改善了单体与聚集体和片段的分离。

参考文献

- 1) Rosenberg AS. Effects of protein aggregates: an immunologic perspective. AAPS J., 8, E501-E507 (2006).
 - 2) Striegel, A. M.; Yau, W. W.; Kirkland, J. J.; Bly, D. D. Modern Size-Exclusion Liquid Chromatography, 2nd ed.; John Wiley & Sons, Inc.: Hoboken, NJ, (2009).
 - 3) 荒川力, 江岛大辅, 津本浩平, Pete Gagnon 利用溶剂抑制色谱法, 生化学第 80 卷第 1 期, pp.45 -51, (2008).
- Nexera、Shim-pack 是岛津制作所株式会社在日本及其他国家的商标。
TORAST 是 SGLC 株式会社的商标。

生物惰性液相色谱仪与多角度光散射检测器联用测定双抗分子量

摘要：本文采用岛津生物惰性液相色谱仪联合多角度光散射检测器测定双抗分子量，为推断双抗连接情况提供依据。本实验采用体积排阻色谱对双抗样品进行分离，多角度光散射检测器检测分子量。通过谱图得知，此双抗样品（单抗 Fc 端融合型）含 3 个主要成分，多角度光散射检测器测得重均分子量分别为 197708 Da、145121 Da、56401 Da，推测双抗样品组成为双抗（Fc 端融合 scFv），单抗（未融合 scFv）和单链抗体 scFv。此分子量测定方法操作简便，快速，成本低，可为双抗连接情况的确定提供依据。

关键词：多角度光散射检测器 双抗 重均分子量

双特异性抗体（以下简称双抗）是同时能够结合两个不同表位或者抗原的抗体，从而阻断或激活双靶点信号通路，介导免疫细胞对肿瘤细胞更好的杀伤，因此可能会获得比单一抗体更好的临床结果，双抗研发也备受关注。

双抗种类繁多，有基于片段化设计的分子，直接将多个抗原结合单元结合在一个没有 Fc 区域的分子上，设计简单，但缺乏 Fc 端，血浆半衰期相对较短，可能存在稳定性和聚集性问题；也有基于保留 Fc 区域设计的对称性分子设计和非对称性分子设计模式，保留 Fc 区域的双抗药物，血浆半衰期较长，可发挥类似于 IgG 的抗体特点。

在双抗产品研发生产过程中，需要对其大小异质性进行分析，反映双抗连接情况，保障产品质量。本文采用体积排阻色谱（SEC）联合多角度光散射检测器（MALS）对单抗 Fc 端融合型对称分子双抗样品大小异质性进行分析，SEC 根据分子量大小分离双抗样品，MALS 检测器测定双抗样品分子量，从而推断双抗样品连接情况。此方法简单高效、准确度高，可用于测定双抗样品分子量。

1. 实验部分

1.1 仪器

本实验采用岛津生物惰性液相色谱系统。具体配置为：

系统控制器	: CBM-40	脱气机	: DGU-405
输液泵	: LC-40 D XSi	自动进样器	: SIL-40C XSi
柱温箱	: CTO-40C	检测器 1	: SPD-M40A
色谱工作站	: LabSolutions Ver. 5.98	检测器 2	: MALS*

MALS*: 多角度光散射检测器

1.2 分析条件

色谱柱 : SHIMSEN Ankylo SEC-300 (300 mm × 7.8 mm I.D., 3.0 μm)
岛津(上海)实验器材有限公司, P/N: 380-01215-10

流动相 : A 相: 50 mM 磷酸盐缓冲液+300 mM NaCl (pH=6.8)
B 相: 乙腈

流 速 : 0.7 mL/min

柱 温 : 30°C

进 样 体 积 : 10 μ L

检 测 波 长 : 260 nm

洗 脱 方 式 : 等度洗脱, B 相浓度为 10%

2. 标准溶液和样品配制方法

牛血清蛋白 (BSA) 标准溶液: 称取牛血清蛋白 2.000 mg, 用超纯水定容至 1 mL, 浓度为 2.000 mg/mL。

双抗溶液: 双抗样品用超纯水溶解, 浓度为 5.000 mg/mL。

3. 结果与讨论

3.1 MALS 测定分子质量原理

当分子被激光照射时, 散射光的强度与其分子量有直接相关, 这种关系可以用光散射 Rayleigh 方程来进行描述。当从 10° 角 (小角度) 来测量低浓度样品光散射强度时, Rayleigh 方程可以简化为: $R_{LALS} = K_{opt} \times c \times Mw$ 。其中, R_{LALS} 为小角度散射光强, 可由 MALS 检测器检测得到; k_{opt} 为光散射常数; c 为浓度, 单位为 mg/mL; Mw 为重均分子量。

如需得到分子量分布, 还需浓度型检测器计算不同分子量的占比, 所以本文将紫外检测器与 MALS 连用, 得到不同分子量占比, 计算数均分子量 M_n 、Z 均分子量 M_z 及分子量分布指数。

MALS 测定分子量还需计算仪器响应常数, 一般采用已知分子量的同类型标准溶液计算得到, 本实验标准溶液为牛血清蛋白溶液。

3.2 牛血清蛋白标准溶液谱图

分析牛血清蛋白标准溶液, 已知分子量为 66500, 得到谱图如图 1 所示。从图可知, 紫外谱图有 3 个峰, 保留时间 12.950 min 的主峰为 BSA 主成分, 10-12min 两峰为聚集体。通过 SECview 软件计算得到主成分含量为 86.29%, 主成分浓度为 1.726 mg/mL, MALS 仪器响应强度为 2.9626×10^{-7} , 紫外仪器响应强度为 8.8552×10^5 。

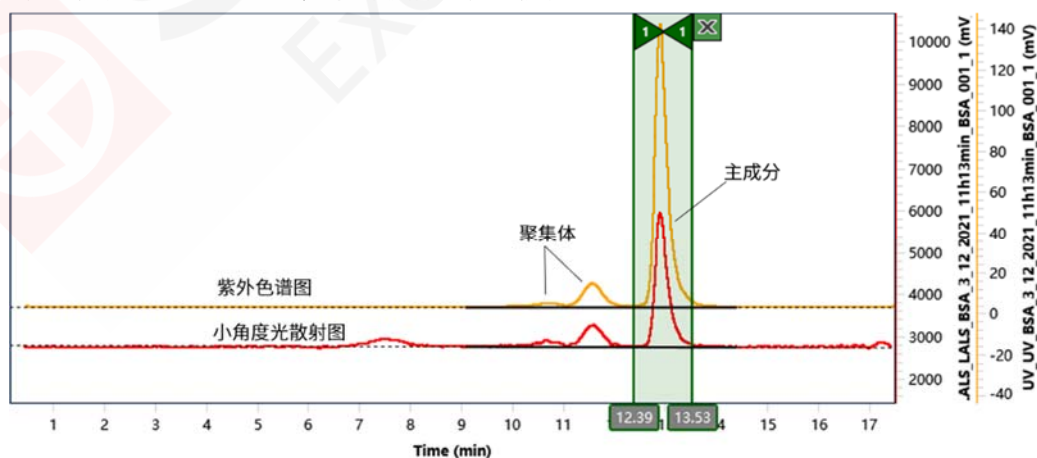


图 1. BSA 溶液谱图

3.3 双抗样品分子量结果

按照 1.2 中仪器方法分析双抗样品，该样品为单抗 Fc 端融合型双抗，得到谱图如图 2 所示。从图中可见：双抗样品共出现 3 个主要色谱峰，通过 SECview 软件计算得到峰 1、峰 2、峰 3 重均分子量 M_w 分别为 197708 Da、145121 Da、56401 Da，三峰重均分子量与数均分子量的比值 (M_w/M_n) 均为 1.00，具体分子量分布见图 3。

峰 2 与峰 3 分子量之和为 201522 Da，与峰 1 分子量偏差为 1.92%，故推测峰 1 为双抗（单抗 Fc 端融合 scFv），峰 2 为单抗（未融合 scFv），峰 3 为单链抗体 scFv。

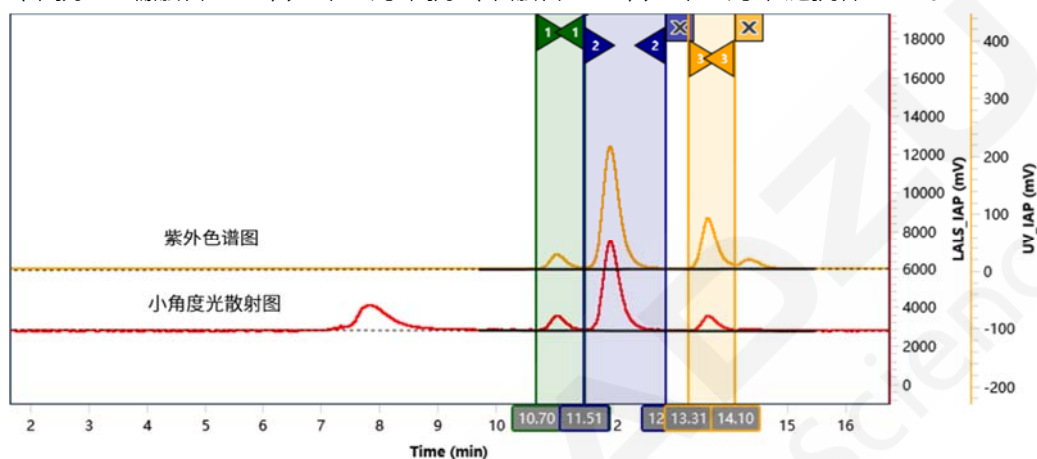


图 2. 双抗样品谱图

Peak Number	Left Limit [Min]	Right Limit [Min]	Retention time [Min]	MW by LS [Da]	Mn by LS [Da]	Mw by LS [Da]	Mz by LS [Da]
Peak_1	10.699	11.538	11.046	194,882	197,453	197,708	197,951
Peak_2	11.514	12.912	11.962	145,151	144,757	145,121	145,464
Peak_3	13.308	14.101	13.641	55,999	56,193	56,401	56,599

图 3. 双抗样品分子量分布

4. 结论

本文采用岛津生物惰性液相色谱仪联合多角度光散射检测器测定双抗分子量，为推断双抗连接情况提供依据。本实验采用体积排阻色谱对双抗样品进行分离，多角度光散射检测器检测分子量。通过谱图得知，此双抗样品（单抗 Fc 端融合型）含 3 个主要成分，多角度光散射检测器测得重均分子量分别为 197708 Da、145121 Da、56401 Da，推测双抗样品组成为双抗（Fc 端融合 scFv），单抗（未融合 scFv）和单链抗体 scFv。此分子量测定方法操作简便，快速，成本低，可为双抗连接情况的确定提供依据。

2.3 基因治疗药物

基因治疗是指将外源正常基因导入靶细胞，以纠正或补偿基因缺陷和异常引起的疾病，也就是通过基因添加、基因修正、基因沉默等方式修饰个体基因的表达或修复异常基因，达到治愈疾病目的的疗法。在这种治疗方式中，以病毒、质粒 DNA、脂质体为载体，将基因序列或核酸片段导入人体细胞后治疗某种疾病的药物则称为基因治疗药物。不管是体内还是体外基因治疗，理想载体的选择是基因治疗成败的关键。因此，寻找合适的载体一直是基因治疗的重要研究领域。当前，按照载体种类的不同，基因治疗药物可分为非复制性病毒载体类、溶瘤病毒载体类、非病毒载体类、嵌合抗原受体 T 细胞类。截至 2018 年 6 月，临床试验中超过 70% 的基因药物载体为病毒载体。目前常用于基因治疗的病毒载体包括逆慢病毒 (LV)、腺相关病毒 (AAV)、腺病毒 (AdV) 和转录病毒 (RV)。其中，腺病毒载体 (AAV) 由于其具有安全性高、免疫原性低、扩散性强、感染范围广、表达稳定、特异性强等特点，被视为基因治疗中目前最具潜力的病毒载体之一，并且已被作为一种安全有效的病毒载体用于基因治疗的临床试验。

对于 AAV 基因治疗药物而言，关键质量检测需要考察多种质量属性，除一般特性外，还包括鉴别、效价、纯度和安全性等多个方面。其中针对 AAV 产品的特异性检测项为衣壳完整性与感染滴度；在放行检测上常包括衣壳鉴别、空壳率、滴度检测；而安全性检测则包括无菌、微生物、支原体、内毒素等。其中，液相色谱法常用于衣壳蛋白鉴别及纯度、蛋白纯度、空壳率、聚集体、病毒载体蛋白亚基比例、病毒载体完整性等方面。本章就岛津生物惰性液相在基因治疗药物用质粒状态、AAV 空壳率等方面的应用做详细介绍，供相关人员参考。

生物惰性液相色谱分析三种构型的质粒样品

摘要：本文使用生物惰性液相色谱仪分析质粒三种构型。通过优化色谱柱温度，使3种状态质粒分离度均大于1.5，实现完全分离。质粒样品重复分析6次，保留时间RSD小于0.1%，峰面积RSD小于1.80%，重复性结果佳。此方法适用于质粒样品的分析。

关键词：生物惰性液相色谱 质粒 分离度 重复性

技术特点：

- ❖ 通过色谱柱温度优化，使3种状态质粒分离度大于1.5，实现基线分离。
- ❖ 使用惰性液相色谱仪分析质粒样品，使样品在仪器中无残留，保留时间和峰面积重复性均佳。

质粒是存在于细胞质中的一类独立于染色体的遗传因子（绝大部分为DNA）。其可以进行自主复制，并能在细胞分裂时恒定的传给子代细胞。所以，质粒作为简单易操作的基因载体，广泛用于基因细胞治疗和核酸药物领域。

标准的质粒DNA具有3种基本构型：超螺旋(Supercoiled, 简称SC)、线性(Linear)和开环(Open circular, 简称OC)。其中超螺旋被认为是一种能够最有效地提高转染效率和目的基因表达量的质粒形态。在基因治疗的研究中更是对药用质粒的超螺旋含量做了明确要求(FDA:>80%, NMPA:≥90%, SMPA:>85%)。所以很有必要将三种质粒分离，并对其含量进行确定。

质粒为含磷酸基团的DNA，易在常规液相色谱仪中残留，从而影响分析的重复性。本文采用生物惰性液相色谱仪分析质粒样品，去除了质粒样品在仪器中的残留。同时通过方法优化，将三种构型质粒完全分离，此方法比常规的电泳法有更高的分辨率和重复性。

1. 实验部分

1.1 仪器

生物惰性超高效液相色谱仪，具体配置信息如下：

系统控制器	: CBM-40	脱气机	: DGU-405
输液泵	: LC-40D XSi×2	自动进样器	: SIL-40C XSi
柱温箱	: CTO-40C	检测器	: SPD-M40
色谱工作站	: LabSolutions Ver. 5.114		

1.2 分析条件

色谱柱	: SHIMSEN Ankylo SAX-PM (150×4.6 mm I.D., 5 μm, 岛津(上海)实验器材有限公司, P/N: 380-01215-64)		
流动相	: A相-20mM Tris-HCl(pH=8.5), B相-1M NaCl in 20mM Tris-HCl(pH=8.5)		
进样体积	: 10 μL	流速	: 1 mL/min

柱温：25°C 波长：260 nm
洗脱方式：梯度洗脱，B相初始浓度为60%，时间程序见表1。

表1. 梯度洗脱程序

Time(min)	Module	Command	Value
10.00	Pumps	Pump B Conc.	90
10.01	Pumps	Pump B Conc.	60
15	Control	Stop	

2. 结果与讨论

2.1 分离度优化

质粒有三种状态，分别为超螺旋、开环和线性，在确定了流动相和色谱柱条件后，通过调整色谱柱温度对分离度进行优化。色谱柱温度为40、30和25°C时采集得到的色谱图如图1所示，分离度结果如表2所示。结果表明，随着色谱柱温度的降低，分离度提高。温度为25°C时，分离度均大于1.5，实现完全分离。确认最终色谱柱温度为25°C。

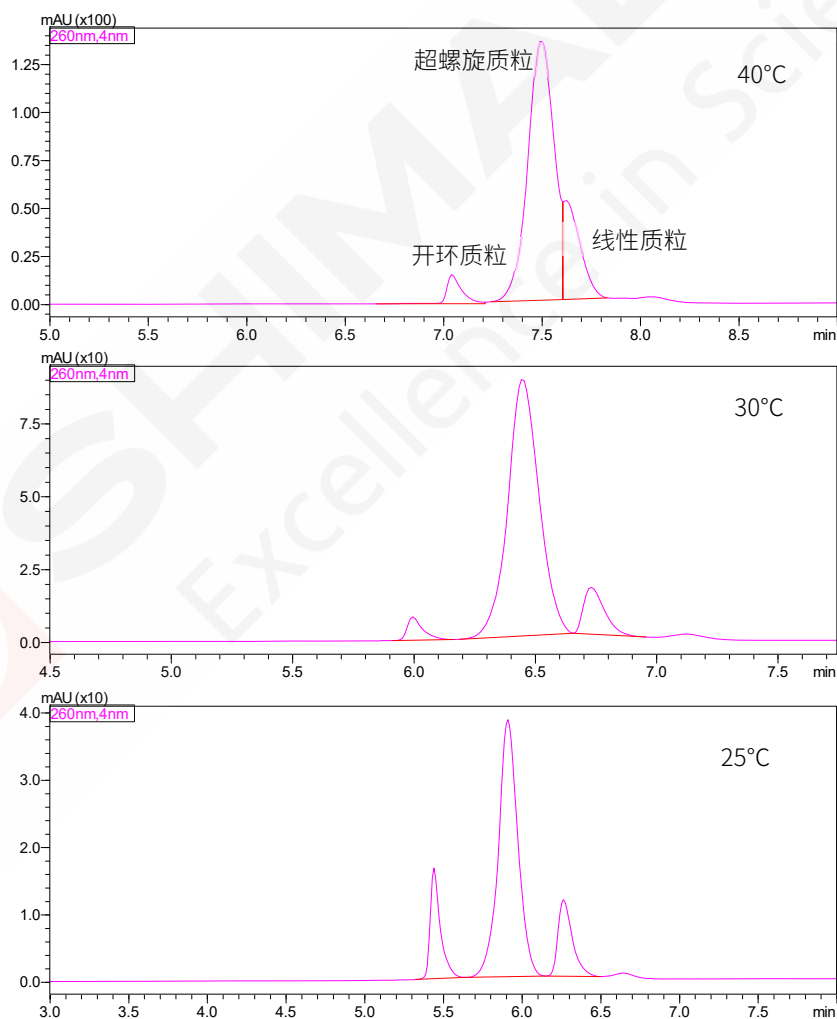


图1. 不同色谱柱温度下的色谱图

表 2. 不同色谱柱温度下三种质粒的分离度

色谱柱温度	分离度		
	开环质粒	超螺旋质粒	线性质粒
40°C	/	2.098	0.194
30°C	/	2.381	1.362
25°C	/	2.563	1.668

2.2 重复性实验结果

质粒结构中含磷酸基团，易在常规液相色谱中残留，从而影响峰面积重复性。本实验采用惰性液相色谱，将 3 种状态质粒重复分析 6 次，考察方法重复性。结果显示，保留时间 RSD 小于 0.09%，峰面积 RSD 小于 1.72%，重复性结果良好。

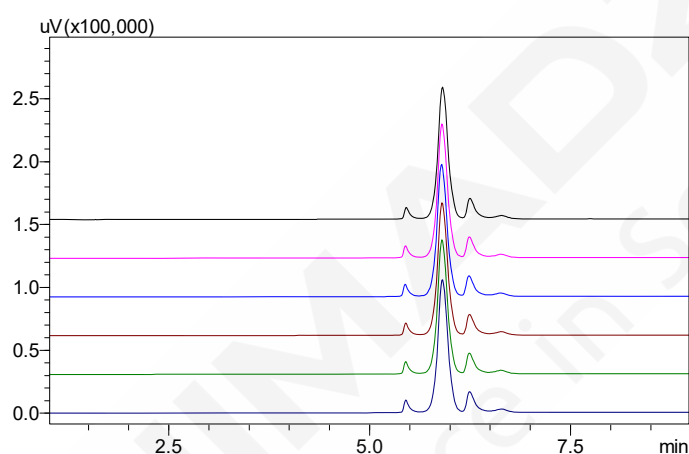


图 2. 三种状态质粒重复分析色谱图比较 (n=6)

表 3. 三种状态质粒重复性实验结果 (n=6)

质粒状态	保留时间 RSD(%)	峰面积 RSD(%)
开环质粒	0.08	1.72
超螺旋质粒	0.09	1.10
线性质粒	0.09	0.69

3. 结论

本文使用生物惰性液相色谱仪分析质粒样品，发现温度对 3 种不同构型质粒的分离影响明显，通过调整温度，可以实现 3 种构型的分离度均大于 1.5。质粒在惰性液相中无残留，此时保留时间和峰面积重复性结果均佳。此方法适用于质粒样品的三种构型分析。

生物惰性液相色谱仪测定腺相关病毒空壳率

摘要：本文采用生物惰性液相色谱仪建立了腺相关病毒空壳率的测定方法。在该测定方法研究中，重点和难点就是优化空衣壳和满衣壳的分离度问题，本实验通过优化色谱条件，可使满衣壳病毒和空衣壳病毒实现了基线分离。重复性实验中，将腺相关病毒样品重复分析6次，保留时间 RSD 小于 0.60%，峰面积 RSD 小于 2.00%。实验结果表明，此方法适用于腺相关病毒空壳率分析。

关键词：腺相关病毒 满衣壳病毒 空衣壳病毒 空壳率

腺相关病毒 (Adeno-associated virus, 简称 AAV) 因其安全性高，免疫原性低，宿主范围广，表达稳定等特点，被视为最有前途和最受欢迎的基因载体之一。

在腺相关病毒制备过程中，除了含有全长 DNA 基因组的完整 AAV 载体（满衣壳病毒）外，有一定比例的 AAV 颗粒不含任何 DNA 基因组，被称为空衣壳病毒。大量空病毒颗粒的存在可能会增加 AAV 载体的免疫原性，增加免疫毒性的风险，或竞争细胞表面受体结合位点、内吞作用及胞内过程，影响 AAV 载体的有效性和安全性。所以在生产质控中，对空壳率（空衣壳病毒/全病毒）进行快速准确的测定非常重要。

本文以某种 AAV 为例，使用岛津生物惰性液相色谱仪开发了对应 HPLC 分析方法，可用于 AAV 空壳率的测定。

1. 实验部分

1.1 仪器

生物惰性超高效液相色谱仪，具体配置信息如下：

系统控制器 : CBM-40 脱气机 : DGU-405
输液泵 : LC-40D XSi×2 自动进样器 : SIL-40C XSi
柱温箱 : CTO-40C 检测器 : RF-20A XS
色谱工作站 : LabSolutions Ver. 5.114

1.2 分析条件

色谱柱 : CIMac™ AAV Empty/Full 0.1 Analytical Column 腺相关完整衣壳分析柱
流动相 : A相: 20 mM bis-tris propane (BTP,pH 9.0)
 B相: 20 mM bis-tris propane (BTP,pH 9.0) with 1M NaCl
流速 : 1.0 mL/min 进样体积 : 1 μL
检测波长 : 激发波长 280 nm 柱温 : 20°C
 发射波长 348 nm
洗脱方式 : 梯度洗脱, B 相初始浓度为 0%, 时间程序见表 1。

表 1. 梯度时间程序

时间	单元	处理命令	值
1.00	泵	B.conc	0

3.00	泵	B.conc	8
6.00	泵	B.conc	8
7.00	泵	B.conc	18
9.00	泵	B.conc	18
10.00	泵	B.conc	40
12.00	泵	B.conc	95
16.00	泵	B.conc	95
16.01	泵	B.conc	0
18.00	控制器	Stop	

2. 结果与讨论

2.1 方法优化

为了测定AAV病毒的准确空壳率，需将满衣壳和空衣壳病毒完全分离。参考文献中流动相梯度条件，如表2所示，采集得到了AAV病毒色谱图，如图1所示。其中峰1和峰2分别为空衣壳和满衣壳，其分离度为0.82，未实现基线分离。

表 2. 梯度时间程序

时间	单元	处理命令	值
0.01	泵	B.conc	0
1.00	泵	B.conc	0
3.00	泵	B.conc	8
4.00	泵	B.conc	20
7.00	泵	B.conc	20
10.00	泵	B.conc	30
12.00	泵	B.conc	95
16.00	泵	B.conc	95
16.01	泵	B.conc	0
18.00	控制器	Stop	

为了提高分离度，关键就是找到空衣壳病毒与满衣壳病毒在色谱柱上保留的临界点。在这个临界点浓度下，空衣壳病毒已洗脱，而满衣壳病毒还被保留在色谱柱上。经过计算，空衣壳病毒洗脱时的流动相B的比例约为8%，所以将比例8%的保持时间增长至6分钟，等空衣壳完全洗脱后，再提高流动相B的比例至18%，满衣壳从色谱柱中洗脱，得到色谱图如图4所示。此时两个色谱峰之间分离度为4.94，实现基线分离。

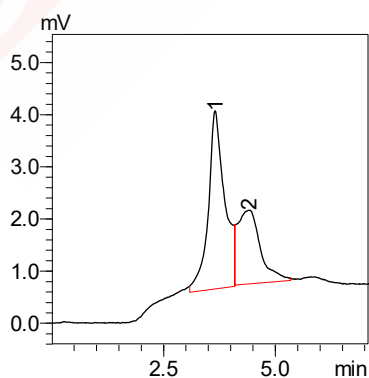


图 1. 初始条件下色谱图

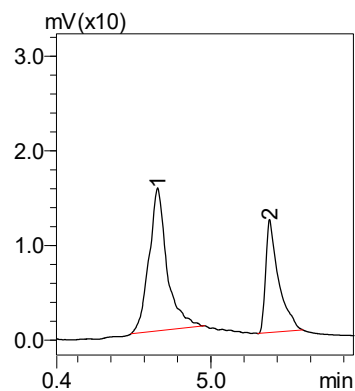


图 2. 优化梯度后色谱图

2.2 重复性实验

按照 1.2 中条件分析 AAV 病毒，重复进样 6 次，考察方法的重复性。结果显示：空衣壳和满衣壳病毒保留时间 RSD 分别为 0.54%、0.20%，峰面积 RSD 分别为 1.90%、0.87%，重复性良好。同时测得此 AAV 样品平均空壳率为 58.85%。

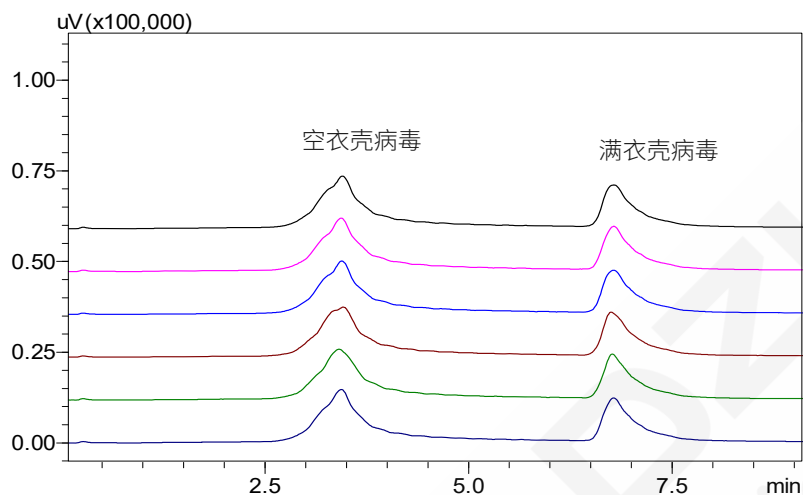


图 3. 重复性实验色谱图

表 3. 某 AAV 样品空壳率分析结果

编号	空衣壳病毒		满衣壳病毒		空壳率
	保留时间 (min)	峰面积	保留时间 (min)	峰面积	
1	3.442	451,291	6.781	319,175	58.6
2	3.435	447,982	6.782	315,197	58.7
3	3.450	448,258	6.783	312,230	58.9
4	3.437	448,731	6.782	317,122	58.6
5	3.406	467,722	6.765	317,865	59.5
6	3.460	463,047	6.750	319,530	59.2
平均	3.438	454505	6.774	316853	58.9
RSD(%)	0.54	1.90	0.20	0.87	0.64

3. 结论

本文采用生物惰性液相色谱仪建立了腺相关病毒空壳率的测定方法。通过优化流动相梯度，满衣壳病毒和空衣壳病毒实现基线分离，测得了准确空壳率，且重复性良好。此方法适用于 AAV 病毒空壳率测定。

2.4 酶残留定量分析

生物催化主要是利用生物酶作为催化剂进行化学转化的过程，由于它们的高选择性（区域选择性和对映体选择性）、催化条件温和、催化效率指数倍增长、低能耗和绿色过程，其手性药物和绿色化学中的应用日益增多。

例如核苷类药物常用的合成方法有化学合成法和生物催化合成两种。随着病毒代谢体系的阐明以及生物催化合成技术进步，运用生物催化合成核苷类似物，已经显示出巨大的优势。生物催化合成核苷类药物的原理是利用微生物中产生的核苷磷酸化酶催化核苷、碱基转换反应，即由廉价供应的天然核苷为原料，将其核糖基进行化学修饰后作为核糖基供体，利用核苷磷酸化酶或脱氧核糖转移酶为酶源，天然的杂环碱基为核糖基受体，通过酶催化合成核苷及其类似物。利用生物催化合成法生产核苷类药物很大可能会造成酶的残留。残留酶作为杂质，如果跟随药物进入人体内，有可能引发高强度的免疫原性等反应，引起较严重的安全性风险。因此基于安全性和质量控制的要求，需要对这些残留生物酶进行严格控制，依据生物酶催化剂的种类建立合适的检测方法，以确定其在中间体或成品中的残留量，使之控制在安全范围内。

对于生物酶类物质的检测，液相色谱法是常见的分析方法。以嘌呤核苷磷酸化酶为例，在液相色谱分析中常会出现明显的吸附现象，造成峰形展宽、灵敏度低、标准曲线不成线性等一系列问题。本章则介绍使用生物惰性液相 Nexera XS inert 对酶类物质开展检测分析的案例，利用惰性特性重点解决吸附问题，供相关人员参考。

生物惰性液相结合尺寸排阻色谱法检测抗病毒药物原料腺嘌呤中嘌呤核苷磷酸化酶残留量

摘要：本文采用岛津生物惰性液相系统结合尺寸排阻色谱法，开发了一种检测抗病毒药物原料腺嘌呤中嘌呤核苷磷酸化酶残留量的新方法。样品以 50°C洗脱液溶解，滤过后上机测定。外标法定量，酶在 1~20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 浓度范围内，相关系数大于 0.995。方法定量限为 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ，换算成样品含量为 0.04 %。三个不同浓度保留时间和峰高的相对标准偏差（RSD）分别在 0.02~0.15 %和 1.20~2.71 %之间，精密度良好。三个不同浓度的加标回收率在 90~105 %之间，平行处理三次样品的 RSD 在 1.27~4.16%，方法准确可靠。

关键词：生物惰性液相 尺寸排阻色谱法 SEC 酶残留 嘌呤核苷磷酸化酶

嘌呤核苷磷酸化酶（PNP）作为生物催化剂，能够选择性地将腺苷水解成腺嘌呤，现已广泛用于微生物酶法生产核苷类抗病毒药物。PNP 是一种具有生物催化活性的蛋白质，分子量约为 30KD。如果药物中存在残留的酶，一旦摄入人体，可能会引发免疫反应，对人体健康造成威胁。腺嘌呤是某些抗病毒药物合成原料，故有必要检测腺嘌呤中 PNP 的残留量，以保证用药安全。

腺嘌呤中嘌呤核苷磷酸化酶残留量的测定充满挑战。嘌呤核苷磷酸化酶在液相色谱分析中表现出明显的吸附现象，造成峰形展宽、灵敏度低、标准曲线不成线性等一系列问题。腺嘌呤溶解性差，仅在强酸条件下易溶，但嘌呤核苷磷酸化酶在强酸条件下不稳定，故确保样品能有一定程度溶解的同时保持酶的良好稳定性至关重要。

本文采用岛津生物惰性液相系统结合尺寸排阻色谱法，开发了一种定量检测抗病毒药物原料腺嘌呤中嘌呤核苷磷酸化酶残留量的新方法，方法线性良好、稳定可靠，供相关检测人员参考。

1. 实验部分

1.1 仪器

本实验使用岛津生物惰性超高效液相色谱系统 Nexera XS inert。具体配置为：

系统控制器	： CBM-40lite	脱气机	： DGU-405
输液泵	： LC-40D XSi	自动进样器	： SIL-40C XSi
柱温箱	： CTO-40C	检测器	： SPD-M40
色谱工作站	： LabSolutions Ver. 5.111		

1.2 分析条件

液相色谱条件

色谱柱： SHIMSEN Ankylo SEC-120 (300 \times 7.8 mm I.D., 3.0 μm)
岛津（上海）实验器材有限公司， P/N: 380-01215-41

洗脱液：150 mM 磷酸盐缓冲液 (pH 6.8) +300 mM 氯化钠，含 20 %乙腈
(称取 8.99 g 无水磷酸二氢钠、10.65 g 无水磷酸氢二钠和 17.54 g 氯化钠，加入 1000 mL 超纯水，溶解、混匀、滤过。取 800 mL 滤液，加入 200 mL 乙腈，混匀，超声 5 min，即得。)

流速：0.5 mL/min
柱温：30 °C
洗脱时间：70 min
进样体积：50 μ L
进样器温度：常温
检测波长：216 nm

1.3 标准溶液配制

准确称取 PNP 粉末样品适量，加入洗脱液，涡旋混匀至完全溶解，配制为 1 mg/mL 的标准储备溶液。以 50 °C 洗脱液逐级稀释为 1、2、5、10 和 20 μ g/mL 的标准系列溶液，备用。

1.4 样品前处理

准确称取腺嘌呤样品 10 mg 于 15 mL 塑料离心管中，加入 4 mL 50 °C 热洗脱液，涡旋混匀至完全溶解，配制为 2.5 mg/mL 的样品溶液，以孔径为 0.22 μ m 的亲水 PTFE 滤膜过滤，取滤液上机分析。实验中接触样品的容器均为聚丙烯材质，以减少酶的吸附。

2. 结果与讨论

2.1 专属性

嘌呤核苷磷酸化酶标准样品、溶剂空白和腺嘌呤样品色谱图见图 1。溶剂空白和腺嘌呤样品在嘌呤核苷磷酸化酶 (PNP) 保留时间处无明显干扰，方法专属性好。

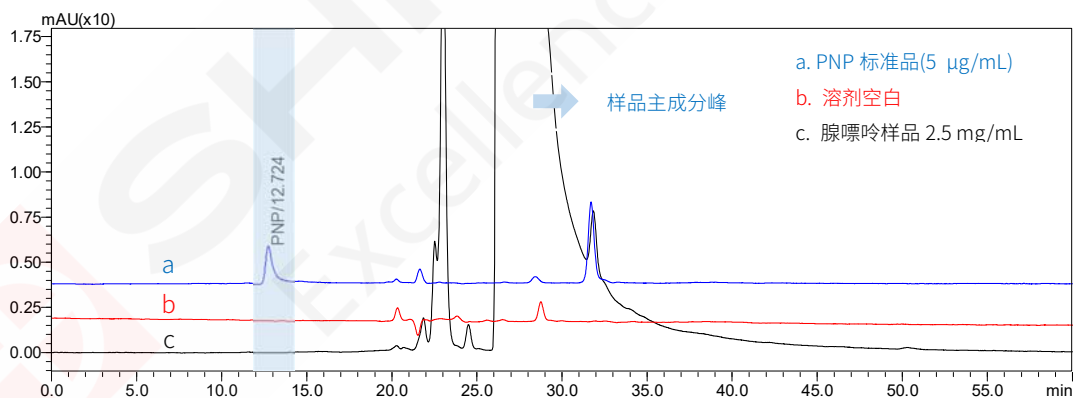


图 1. 嘌呤核苷磷酸化酶标准样品、溶剂空白和腺嘌呤样品色谱图

2.2 线性关系

按照 1.3 配制五个不同浓度的标准系列溶液，按照 1.2 中的分析条件进行测定。以峰高为纵坐标，以浓度为横坐标，外标法绘制校准曲线。嘌呤核苷磷酸化酶校准曲线见图 2，嘌呤核苷磷酸化酶定量限色谱图见图 3，线性关系、检出限 (S/N=3) 和定量限见表 1。

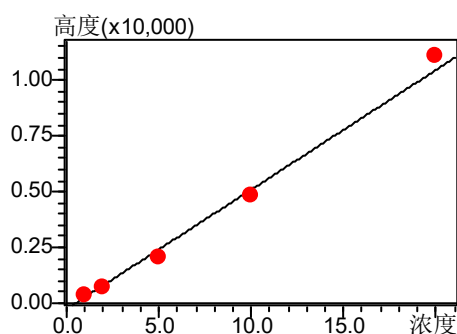


图 2. PNP 校准曲线

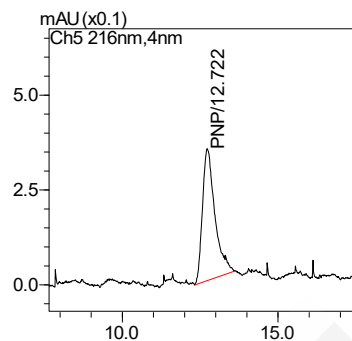


图 3. PNP 定量限色谱图 (1 µg/mL)

表 1. 线性关系、检出限和定量限 (权重: 1/A)

名称	线性范围 (µg/mL)	准确度(%)	相关系数 r	检出限 (S/N=3, µg/mL)	定量限 (µg/mL)	定量限 S/N
PNP	1~20	88.2~113.9	0.9956	0.126	1	29.69

2.3 精密度实验

三个不同浓度嘌呤核苷磷酸化酶标样连续进样 6 次, 考察仪器的精密度, 保留时间和峰高的 RSD 分别在 0.02~0.15 % 和 1.20~2.71 % 之间, 仪器精密度良好。

表 2. 精密度结果 (n=6)

浓度 (µg/mL)	保留时间(RSD%)	峰高(RSD%)
1	0.15	2.71
5	0.03	1.35
20	0.02	1.20

2.4 加标回收实验

准确称取腺嘌呤样品 10 mg, 准确加入 PNP 标品, 再按照 1.4 样品制备流程进行前处理, 制成腺嘌呤样品中 PNP 加标量为 0.04 %、0.1 % 和 0.2 % 的三个不同浓度的加标样品, 加标回收结果见表 3。三个不同浓度的加标回收率在 90~105 % 之间, 平行处理三次样品的 RSD 在 1.27~4.16% 之间, 方法准确度好。

表 3. 加标回收结果 (n=3)

腺嘌呤样品中 PNP 加标量 (%)	腺嘌呤样品中 PNP 加标实测值 (%)	回收率/%	RSD/%
0.04	0.042	105	1.27
0.1	0.093	93	1.27
0.2	0.180	90	4.16

3. 结论

使用岛津生物惰性液相色谱系统结合尺寸排阻色谱方法, 开发了一种定量测定抗病毒药物原料腺嘌呤中嘌呤核苷磷酸化酶残留量的新方法。样品经过 50°C 热洗脱液溶解, 滤过后上机分析, 既可保证腺嘌呤完全溶解, 同时也能保持 PNP 良好的稳定性。生物惰性液相色谱系统结合优选的洗脱液可以有效抑制 PNP 的吸附作用, 提升灵敏度, 获得了良好的分析结果。



本公司三条工厂获得 ISO 认证

JQA-0376

⊕ 岛津企业管理 (中国) 有限公司/岛津 (香港) 有限公司

<http://www.shimadzu.com.cn>

北京

北京市朝阳区朝外大街16号中国人寿大厦14层
邮政编码: 100020
电话: (010)8525-2310/2312 传真: (010)8525-2531

沈阳

沈阳市青年大街167号北方国际传媒中心11层
邮政编码: 110016
电话: 024-23255577 传真: (024)2325-5577

西安

西安市锦业一路56号研祥城市广场A座501
邮政编码: 710065
电话: 029-62737878 传真: (029) 6273-7879

乌鲁木齐

乌鲁木齐市中山路339号中泉广场14H座
邮政编码: 830002
电话: (0991)230-6271/6272 传真: (0991)230-6273

郑州

郑州市中原路220号裕达国际贸易中心A座20层2011室
邮政编码: 450007
电话: (0371)8663-2981/2983 传真: (0371)8663-2982

上海

上海市徐汇区宜州路180号华鑫慧享城B2栋
邮政编码: 200233
电话: (021)3419-3888 传真: (021)3419-3666

成都

成都市锦江区创意产业商务区三色路38号博瑞·创意成都写字楼
B座12层
邮政编码: 610063
电话: (028)8619-8421/8422 传真: (028)8619-8420

南京

南京市鼓楼区汉中中路2号亚太商务楼27层B座
邮政编码: 210005
电话: (025)8689-0258 传真: (025)8689-0237

重庆

重庆市渝中区青年路38号重庆国贸中心1702座
邮政编码: 400010
电话: (023)6380-6068/6058 传真: (023)6380-6551

武汉

武汉市武昌区临江大道96号武汉万达中心31层3112室
邮政编码: 430060
电话: (027) 5908-0488 传真: (027) 5908-0470

广州

广州市天河区高唐路230号广电智慧大厦
邮政编码: 510656
电话: (020) 3718-3888 传真: (020) 3718-3804

昆明

昆明市青年路432号天恒大酒店 908室
邮政编码: 650021
电话: (0871)6315-2986/2987 传真: (0871)6315-2991

深圳

深圳市福田区天安数码城天展大厦1楼 F2.6-1C
邮政编码: 518040
电话: (0755)8340-2852 传真: (0755)8389-3100

长沙

湖南省长沙市芙蓉区解放西路188号国金中心T1大楼3115室
邮政编码: 410005

香港

香港九龙尖沙咀海洋中心1028室
SUITE 1028, OCEAN CENTRE, HARBOUR CITY,
TSIM SHA TSUI, KOW LOON, HONG KONG
电话: (00852)2375-4979 传真: (00852)2199-7438

用户服务热线电话: 800-8100439
400-6500439

本产品样本所宣传的内容, 以本版本为准
样本中的试验数据除注明外为本公司的试验数据

日本总公司工厂已通过ISO质量·环境管理体系的认证

注: 此样本所有信息仅供参考, 如有变动恕不另行通知