

## Labsolutions MD 用于寡核苷酸及其相关杂质的分析方法开发

01-00558-CN

藤崎真一、铃木里沙

### 特点描述

- ◆ 通过 LabSolutions MD 可以提高寡核苷酸和相关杂质最佳分离条件的方法开发工作效率。
- ◆ 寡核苷酸和相关杂质峰可以通过单四极杆质谱仪 LCMSTM-2050 进行正确追踪。
- ◆ 惰性 UHPLC 系统 Nexera™MXS inert、Shim-pack Scepter™Clarix (惰性柱) 可抑制寡核苷酸的金属配位吸附, 并获得良好的峰形。

### 简介

以反义寡核苷酸等为代表的核酸药物通过作用于细胞内外的靶点(基因、蛋白等)发挥药效。核酸药物是通过化学合成生产的,但在其合成过程中会引入错误长度的产物以及保护基团等多种杂质,因此,如何正确分离含有杂质的大量寡核苷酸是一大挑战。LC 分析中,反相离子对色谱法(RP-IP)是一种分离带有电荷的物质时常用的分离模式。在 RP-IP 中,分离模式会随着流动相的离子对试剂添加浓度以及有机溶剂成分的不同而发生变化,但是,变化的模式取决于寡核苷酸链长、碱基组成和修饰键的有无等,因此,针对每个目标序列分别进行分离优化尤为重要。本文介绍使用分析方法开发辅助软件 LabSolutions MD,针对具有不同链长和修饰键的寡核苷酸及相关杂质,分别通过筛选和优化阶段,高效地实现寡核苷酸和相关杂质的最佳分离。

### 样品信息

作为测定样品使用的寡核苷酸序列(共 6 种)如表 1 所示。将全长的产物(FLP)以及 3' 端、5' 端缺失 1 个或 3 个碱基的 n-1(3'), n-1(5') 和 n-3 的缺失体、或添加 1 个碱基的 n+1 加合体、5' 端的由硫代磷酸酯修饰为磷酸二酯键的 PS → PO 突变体的 5 种杂质,共计 6 种物质的混合样品作为合成反义寡核苷酸的模型样品使用。

表 1 目标分析样品

名称	序列(5' → 3')	长度
FLP	T*-mC*-T*-T*-G*-dG-dT-dT-dA-dC-dA-dT-dG-dA-dA-A*-T*-mC*-mC*-mC*	20 mer
n-1(3')	T*-mC*-T*-T*-G*-dG-dT-dT-dA-dC-dA-dT-dG-dA-dA-A*-T*-mC*-mC*	19 mer
n-1(5')	mC*-T*-T*-G*-dG-dT-dT-dA-dC-dA-dT-dG-dA-dA-A*-T*-mC*-mC*-mC*	19 mer
n-3	T*-G*-dG-dT-dT-dA-dC-dA-dT-dG-dA-dA-A*-T*-mC*-mC*-mC*	17 mer
n+1	T*-T*-mC*-T*-T*-G*-dG-dT-dT-dA-dC-dA-dT-dG-dA-dA-A*-T*-mC*-mC*-mC*	21 mer
PO	FLP 5' 端的 PS → PO 变化体	20 mer

备注: \* = 2'-O-methoxyethyl, m = 5-methyl, d = 2'-deoxy, PS(full)

### 流动相的筛选

筛选阶段(分析条件:表 2)中主要考察对保留和分离造成重大影响的因素,研究了水相流动相中的 HFIP 以及离子对试剂(三乙胺: TEA)的添加浓度、有机流动相中的乙腈和甲醇混合比例。具体来说,将 HFIP 的添加浓度设为 100、200 mmol/L (2 种水平)、TEA 的添加浓度设为 5、10、15、20 mmol/L (4 种水平)、有机流动相中的乙腈比例设为 0、50、100% (3 种水平),共创建了 24 (2×4×3) 种实验设计,以预测最佳的组合。LabSolutions MD 可以按照流动相和色谱柱等各种参数组合自动生成(图 1 的 ①~⑤)的步骤)实验设计,不会出现失误。此外,使用流动相混合功能,可以自动制备含不同 HFIP 和 TEA 添加浓度以及有机溶剂比例的流动相。通过点击选择所使用的流动相(图 1 的 ①),即可按照所选择的添加浓度和有机溶剂比例自动制备流动相,因此,不仅可以大幅减少手动制备的负担,还能防止出现制备失误。

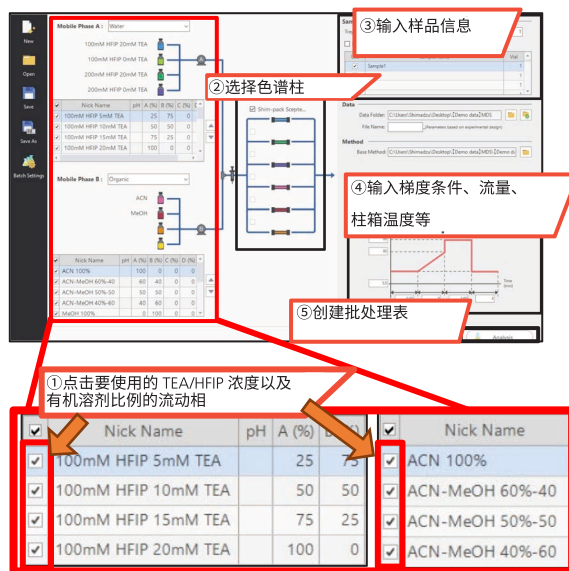


图 1 实验设计创建画面

表 2 筛选条件

系统	: Nexera XS 生物惰性系统 (方法开发系统)
色谱柱	: Shim-pack Scepter Claris (100 mm × 2.1 mm I.D., 3 μm, P/N: 227-31210-05 *) * 岛津 GLC 产品编号
柱温	: 60°C
进样量	: 2 μL
流动相	
泵 A - 流路 A	: 100 mmol/L HFIP <sup>1</sup> 和 20 mmol/L TEA <sup>2</sup> 水溶液
- 流路 B	: 100 mmol/L HFIP 水溶液
- 流路 C	: 200 mmol/L HFIP 和 20 mmol/L TEA 水溶液
- 流路 D	: 200 mmol/L HFIP 水溶液
泵 B - 流路 A	: 乙腈
- 流路 B	: 甲醇
流速	: 0.4 mL/min
时间程序 (%B)	: 6% (0 min) → 24% (36 min) → 50% (36-37 min) → 6% (37-46 min)
检测	: 260 nm (SPD-M40, UHPLC 惰性池)
系统	: LCMS-2050
离子化模式	: ESI/APCI (DUIS™), 负离子模式
扫描模式	: SCAN (m/z 500-2000)
雾化气流速	: 2.0 L/min (N2)
干燥气流速	: 5.0 L/min (N2)
加热气流速	: 7.0 L/min (N2)
DL 温度	: 200°C
脱溶剂温度	: 450°C
接口电压	: -2.0 kV

\*1 1,1,1,3,3,3-六氟-2-丙醇  
\*2 三乙胺

## ■流动相的筛选结果

通过改变水相中的 HFIP 和 TEA 添加浓度、有机相中的乙腈和甲醇的混合比例形成的 24 种分析条件的色谱图 (FLP 和各杂质, 共 6 种) 如图 2 所示。

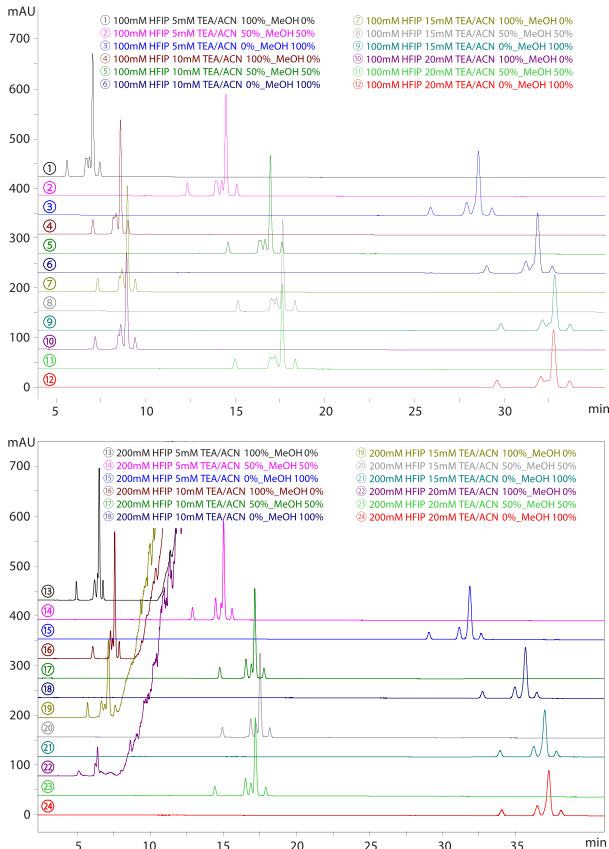


图 2 通过流动相的筛选获得的色谱图 HFIP 添加浓度 100 mmol/L (上)、200 mmol/L (下)

由于 HFIP 和 TEA 的添加浓度以及有机溶剂成分不同, 可以发现 FLP 和各杂质的保留和分离会发生很大变化。另外, 在 HFIP 为 200 mmol/L、乙腈为 100% 的条件 (图 2 中的⑬、⑯、⑰、⑱) 下, 观察到了基线的变化。这可能会对各样品的峰形以及定量造成影响。

## ■通过筛选结果快速预测最佳流动相条件

为了在筛选中获得与研究条件数量一致的色谱图, 需要对各个分析条件获得目标物的分离效果进行评估, 但这项工作需要具有色谱法相关知识和经验, 而且十分耗时。LabSolutions MD 可以使用如下的公式 1 对各条件下的分离状态进行定量评估和排序, 不依赖分析人员的感觉和经验, 任何人都可以快速、轻松地预测最佳条件。

$$(\text{评价值}) = P \times (R_{S1} + R_{S2} + \dots + R_{Sp} - 1) \dots (\text{公式 1})$$

评价值可通过峰检测数 (P) 和分离度 (Rs) 总和的乘积进行计算。将筛选阶段中得到的评价值按照从高到低的顺序表示, 结果如图 3 所示。HFIP 的添加浓度为 100 mmol/L、TEA 的添加浓度为 10 mmol/L、有机流动相使用乙腈 / 甲醇 = 50:50 时获得最高的评价值, 为 FLP 和各种杂质分离的最佳流动相条件 (图 2 中⑤的色谱图、该色谱图在图 4 中放大显示)。另外, 在各杂质中, n-1(5') 和 n-1(3') 的分离度最小, 推测这是因为 n-1(5') 和 n-1(3') 的链长相同, 结构类似。

然后, 在优化阶段, 研究了柱温箱温度、梯度程序等各种 LC 参数的最佳水平, 预测了进一步改进分离度, 具有更高稳定性的条件。

MPA Nick Name	MPB Nick Name	Evaluation Value
100mM HFIP 10mM TEA	ACN 50%_MeOH 50%	54.074
100mM HFIP 15mM TEA	ACN 50%_MeOH 50%	53.77
100mM HFIP 5mM TEA	ACN 50%_MeOH 50%	52.477
100mM HFIP 20mM TEA	ACN 50%_MeOH 50%	51.919
200mM HFIP 20mM TEA	ACN 50%_MeOH 50%	47.016
200mM HFIP 15mM TEA	ACN 50%_MeOH 50%	46.926
200mM HFIP 10mM TEA	ACN 50%_MeOH 50%	46.836
200mM HFIP 5mM TEA	ACN 50%_MeOH 50%	45.719
100mM HFIP 10mM TEA	ACN 100%_MeOH 0%	38.822
200mM HFIP 10mM TEA	ACN 100%_MeOH 0%	37.732

图 3 各条件通过评价值排序 (按照评价值从高到低的顺序显示前 10 的条件)

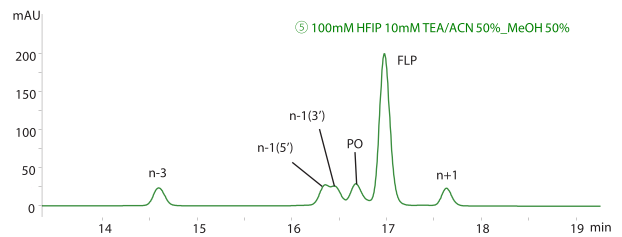


图 4 评价值最高的色谱图 (放大图 2 中⑤的色谱图)

## ■各种 LC 参数的优化

针对在筛选过程中获得了最佳分离的水相及有机相，将有机流动相中的乙腈比例在 40、50、60%（3 种水平）中变化，柱温箱温度在 55、60、65℃（3 种水平）中变化，梯度初始浓度在 6、7、8%（3 种水平）中变化，优化了 FLP 和各杂质的分离。获得的色谱图如图 5~7 所示。从中观察到，有机流动相中的乙腈比例越高、柱温箱温度越高、梯度初始浓度越高，则各峰的分度越高的趋势。

然后对 FLP 和各杂质进行峰值追踪，以实现分离度在设计空间中的全面可视化。

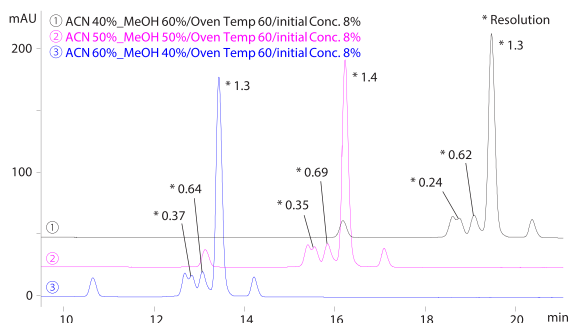


图 5 改变了乙腈比例的色谱图  
40% (①)、50% (②)、60% (③)

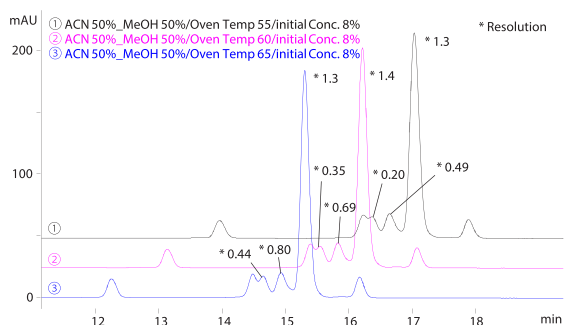


图 6 改变了柱温箱温度的色谱图  
55 °C (①)、60 °C (②)、65 °C (③)

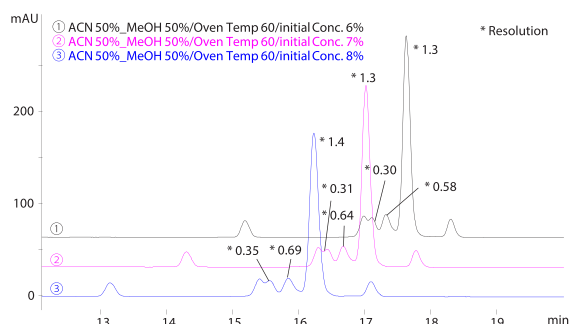


图 7 改变了梯度初始浓度的色谱图  
6% (①)、7% (②)、8% (③)

## ■杂质峰的 MS 追踪

在柱温箱温度为 60℃、梯度初始浓度为 8%、有机流动相中的乙腈比例为 50% 和 60% 的条件下获得的 LC 色谱图以及各杂质 MS 光谱的基峰 m/z 如图 8 所示，各杂质的 UV 光谱如图 9 所示。结果表明，在寡核苷酸的杂质中，n-3、n-1(5')、n-1(3')、PO、n+1 的 UV 光谱非常类似，相似度均为 0.99 以上，通过 UV 光谱进行追踪非常困难。另一方面，LabSolutions MD 可以依据 LCMS-2050 的质谱信息进行峰追踪，因此，针对 UV 光谱类似的有关物质，也能进行准确地鉴定（图 8）。

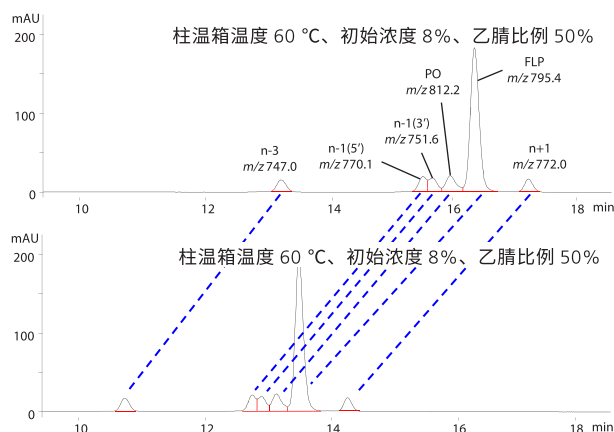


图 8 柱温箱温度 60 °C、初始浓度 8%、乙腈比例 50% (上) 及 60% (下) 的 LC 色谱图  
\* 虚线表面通过质谱信息追踪有关物质

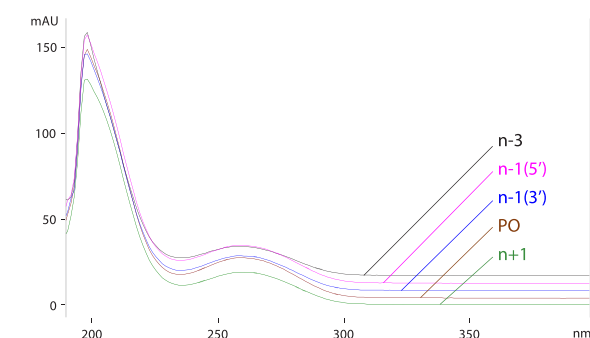


图 9 寡核苷酸的杂质的 UV 光谱

本研究追踪寡核苷酸的杂质时使用了通过 LCMS-2050 获得的质谱信息，LabSolutions MD 除质谱信息之外，还可以使用 UV 光谱相似度、面积值等的任意参数准确追踪分析对象的峰。即使因为分析条件的变更导致峰洗脱位置发生变化的情况下，也可以针对全部数据自动识别峰，大幅缩短鉴定所需的工作量（图 10）。只需从下拉列表中选择用于追踪的项目（图 10 中的红框内），即可轻松对所有数据进行峰追踪。

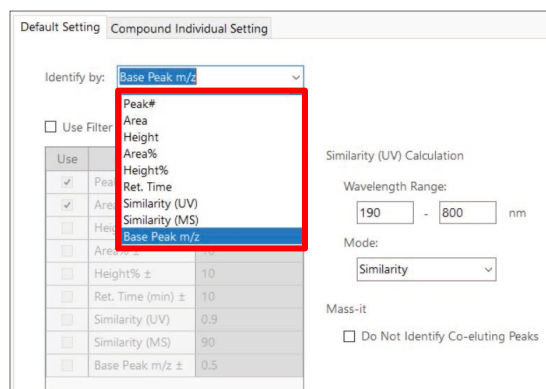


图 10 LabSolutions MD 的峰追踪设置画面

然后，通过设计空间对 FLP 及各杂质的分离度进行可视化，预测了具有良好的分离度和高稳定性的最佳分离条件。

## ■通过设计空间预测最佳分析条件

将有机相中的乙腈比例、柱温箱温度与 FLP 和各杂质分离度的设计空间如图 11 所示。图中的红色区域表示分离度大、蓝色区域表示分离度小的区域。通过设计空间的绘制可知，柱温箱温度越高，分离效果越好，而乙腈的最佳配比与化合物有关。

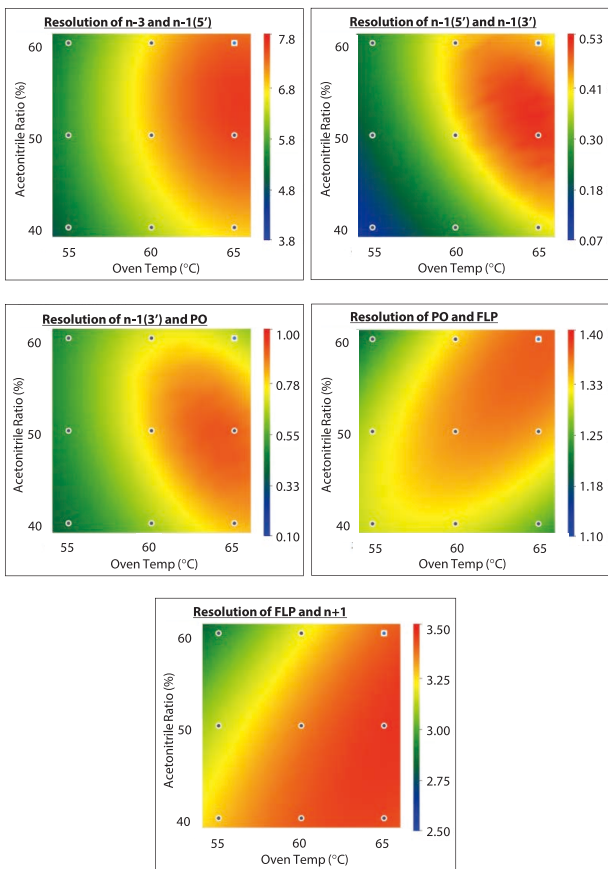


图 11 FLP 和各杂质的分离度的设计空间  
\* 梯度初始浓度为 8%

LabSolutions MD 通过重叠绘制多个设计空间，可以自动预测满足多个标准的最佳条件。例如，将最难分离的 n-1(5') 和 n-1(3') 的分离度最大、第 2 难分离的 n-1(3') 和 PO 的分离度为 0.7 以上、最终峰 (n+1) 的保留时间 16 分钟以下作为标准，通过重叠绘制满足上述标准的条件区域进行预测，确认最佳分析条件 (图 12)。图 12 的绿线内的区域表示 n-1(3') 和 PO 的分离度小于 0.7 的区域，橙线内表示最终峰的保留时间大于 16 分钟的区域，剩下的区域用黑线阴影表示，红色圆圈内的点 A 是 n-1(5') 和 n-1(3') 的分离度最大的条件 (乙腈比例 54%、柱温箱温度 65°C、初始浓度 8%)。通过叠加最后一个洗脱峰的出峰时间和最小分离度的设计空间，可以很容易地找到同时满足分离度和更短分析时间的最佳条件。

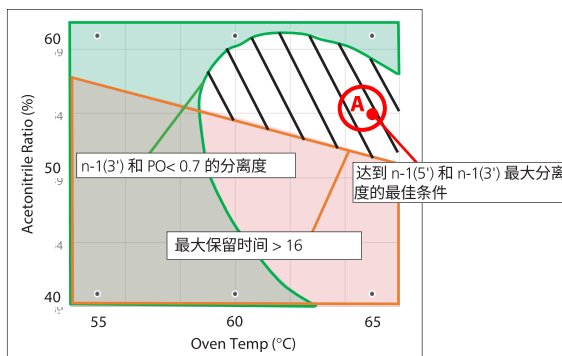


图 12 通过重叠绘制设计空间预测最佳条件

## ■最佳分离条件下的色谱图

通过设计空间预测的最佳条件 (点 A) 下的色谱图如图 13 所示。n-1(3') 和 PO 的分离度为 0.7 以上、最终峰 (n+1) 的保留时间在 16 分钟以内，并考虑到缩短分析时间，完成了对分离的优化。虽然 n-1(5') 和 n-1(3') 的链长相同，结构类似，但可通过设计空间将分离度进行全面可视化，无需依靠分析人员的感觉和经验即可进行分离优化。

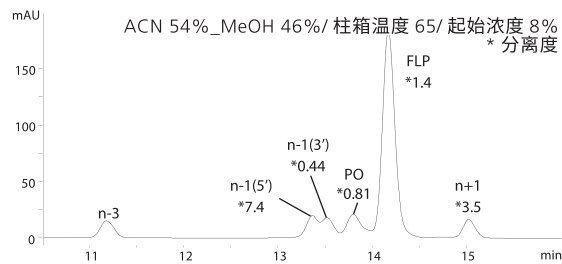


图 13 优化条件下的色谱图  
HFIP 的添加浓度 100 mmol/L、TEA 的添加浓度 10 mmol/L

## ■结论

在寡核苷酸的分析中，分离度随着添加到流动相中的 HFIP 以及离子对试剂的浓度、有机溶剂成分、柱温箱温度以及梯度程序等各种 LC 参数的不同而发生变化。另外，变化的行为取决于寡核苷酸链长、碱基组成和修饰键的有无等，因此，需要针对每个目标序列分别进行分离优化。另一方面，针对各目标序列分别进行全面分析，解析所获得的庞大的数据，预测最佳条件都需要耗费大量的工作量。使用 LabSolutions MD 时，可自动创建实验设计和制备流动相，另外，在分析方面，可实现峰追踪的自动化，通过设计空间高效地预测最佳条件。如本文的所示，通过 LabSolutionsMD 与惰性 UHPLC 系统 NexeraXSinert、Shim-packScepterClaris (惰性柱)、单四极杆质谱仪 LCMS-2050 的组合，可以提高寡核苷酸分析方法开发工作流程的效率。

## ■致谢

本应用新闻获得了旨在实现 AMED 下一代治疗和诊断的原研药基础技术开发事业“核酸药物的生产、纯化、分析基础技术的开发”项目 (代表: 小比贺聪) 的大力支持。

岛津应用云



LabSolutions、LCMS、Nexera、Shim-packScepter 和 DUIS 是岛津制作株式会社或其相关公司在日本及其他国家/地区的商标。



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>

用户服务热线电话: 800-810-0439  
400-650-0439

免责声明:

\* 本资料未经许可不得擅自修改、转载、销售;  
\* 本资料中的所有信息仅供参考, 不予任何保证。  
如有变动, 恕不另行通知。

第一版发行日: 2023 年 04 月