

反相离子对色谱分析寡核苷酸的高效方法开发

01-00766-CN

Shinichi Fujisaki、Risa Suzuki

特点描述

- ◆ LabSolutions MD 可以提高寡核苷酸和有关杂质的方法开发效率。
- ◆ LCMS-2050 单四极杆质谱仪可以准确跟踪寡核苷酸和相关杂质的每个峰。
- ◆ 配有 Shim-pack Scepter™ Claris (惰性涂层无金属色谱柱) 的 Nexera™ XS inert (UHPLC 系统) 可使得样品流路完全惰性, 以实现寡核苷酸的最佳色谱分离。

■ 引言

核酸类药物 (如反义寡核苷酸) 通过与细胞内外的靶标 (基因和蛋白质) 相互作用而发挥功效。核酸药物通过化学合成生产, 但合成工艺会引入杂质, 如较短和较长长度的产物和保护基团。因此, 需要适当分离靶寡核苷酸。

对于 LC 分离, 一种常用的模式是反相离子对色谱 (RP-IP)。根据离子对试剂的浓度和有机溶剂的组成, RP-IP 色谱分析获得的分离效果可能会有所不同。此外, 根据产物的长度、核酸碱基和修饰的存在, 分离行为会有所不同。因此, 必须优化每个寡核苷酸序列的分离。本文介绍了如何利用 LabSolutions MD (一款支持方法开发的专用软件) 分别在初始筛选和优化阶段高效实现寡核苷酸和相关杂质的最佳分离。

■ 样品信息

一种靶寡核苷酸和五种具有不同序列的相关杂质被用作反义寡核苷酸的模型样品 (表 1)。制备全长产物 (FLP)、n-1 (3' 端)、n-1 (5' 端) 和 n-3 的缺失序列 (作为短序列)、n+1 的加成序列 (作为长链) 和 PO (在 5' 端从硫代磷酸酯修饰为磷酸二酯) 作为样品混合物。

表 1 寡核苷酸和有关杂质的序列

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 (在 5' 端从硫代磷酸酯修饰为磷酸二酯)	20 mer

注: * = 2'-O- 甲氧基乙基, m = 5- 甲基, d = 2'- 脱氧, PS (全)

■ 流动相的初步筛选

对于初始筛选 (表 2 中的分析条件), 考虑了对分离有较大影响的参数, 例如 HFIP 和离子对试剂 (三乙胺: TEA) 在流动相水相中的浓度, 以及乙腈和甲醇在有机溶剂中的混合比。具体而言, 评价了 100 和 200 mmol/L 的两种不同浓度水平的 HFIP、5、10、15 和 20 mmol/L 的四种不同浓度水平的 TEA 以及有机溶剂中 0、50 和 100% 的三种不同水平的乙腈比例 (总共 24 个模式 (2×4×3)), 以便找到靶寡核苷酸和杂质的最佳分离组合。LabSolutions MD 可通过设置多种类型的流动相和柱温箱温度等参数快速轻松地生成分析计划 (图 1 中的步骤 (1) 至 (5))。此外, 流动相混合功能可自动制备具有不同 HFIP 和 TEA 浓度以及乙腈和甲醇混合比例的流动相, 只需点击流动相即可使用 (图 1 中步骤 (1)) 进行自动筛选。这显著减少了手动制备所需的工作量并防止了人为制备错误。

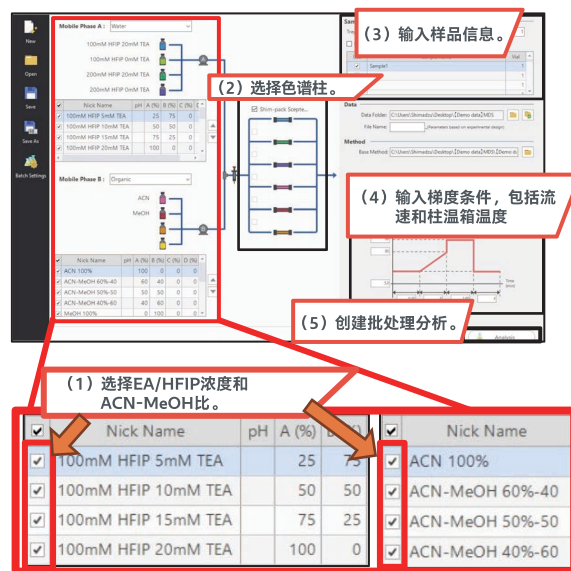


图 1 分析计划的创建步骤

表 2 初始筛选的分析条件

仪器:	Nexera XS inert (方法开发系统)
色谱柱:	Shim-pack Scepter Claris (100 mm × 2.1 mm I.D., 3 μm) ^{*1}
温度:	60°C
进样量:	2 μL
流动相:	
泵 A	- 线 A: 100 mmol/L HFIP ^{*2} 和 20 mmol/L TEA ^{*3} 水溶液 - 线 B: 100 mmol/L HFIP 水溶液 - 线 C: 200 mmol/L HFIP 和 20 mmol/L TEA 水溶液 - 线 D: 200 mmol/L HFIP 水溶液
泵 B	- 线 A: 乙腈 - 线 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)
检测器:	260 nm (SPD-M40, UHPLC 惰性流通池)
仪器:	LCMS-2050
离子化:	ESI/APCI (DUIS™), 负离子模式
型号:	SCAN (m/z 500-2000)
雾化气:	2.0 L/min (N ₂)
干燥气:	5.0 L/min (N ₂)
加热气体:	7.0 L/min (N ₂)
DL 温度:	200°C
脱溶温度:	450°C
接口电压:	-2.0 kV

*1 P/N: 227-31210-05 (Shimadzu GLC 编号)

*2 1,1,1,3,3,3- 六氟 -2- 丙醇

*3 三乙胺

流动相的初步筛选结果

在不同的 HFIP 和 TEA 浓度以及不同的乙腈和甲醇混合比条件下测得的色谱图 (FLP 和每种杂质) 如图 2 所示。

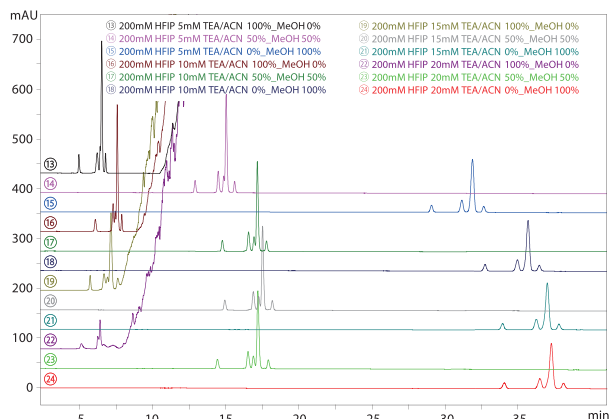


图 2 流动相筛选 100 mmol/L HFIP (上图) 200 mmol/L HFIP (下图) 获得的色谱图

流动相筛选结果表明, 水流动相中 HFIP 和 TEA 的浓度以及有机溶剂中乙腈和甲醇的对比对 FLP 及相关杂质的分离有很大影响。此外, 在 200 mmol/L HFIP 和 100% 乙腈比率的条件观察到基线波动 (图 2 中 ⑬、⑯、⑰和 ⑳)。这可能会影响每个样品的峰形和定量。

快速找到最佳条件

由于筛选阶段生成的色谱图与分析计划数量一样多, 因此必须对它们进行评估, 以确定哪一个分析方法最佳。手动检查所有色谱图既麻烦又耗时。LabSolutions MD 可以使用下列公式 (公式 1) 快速轻松地找到最佳条件, 以定量评估色谱分离。

$$(\text{评估值}) = P \times (R_{s1} + R_{s2} + \dots + R_{SP-1}) \quad (\text{公式 1})$$

评估值的计算方式为检出峰数(P)乘以所有峰的分度度(Rs)之和。图 3 按从高到低的顺序列出了通过流动相筛选获得的评估值。结果表明, 最佳条件为 HFIP 浓度为 100 mmol/L, TEA 浓度为 10 mmol/L, 乙腈浓度为 50%, 此时测定值最高。(图 2 中的色谱图 ⑤, 图 4 中放大) 结果还表明 n-1 (5') 和 n-1 (3') 未很好地分离。这大概是因为 n-1 (5') 和 n-1 (3') 具有相同长度的相似结构。

接下来, 对于优化阶段, 考虑柱温箱温度和梯度程序的参数以进一步改善分离。

MPA 昵称	MPB 昵称	评估值
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 按评估值对各条件的排序 (从最高到最低列出的前 10 个色谱图)

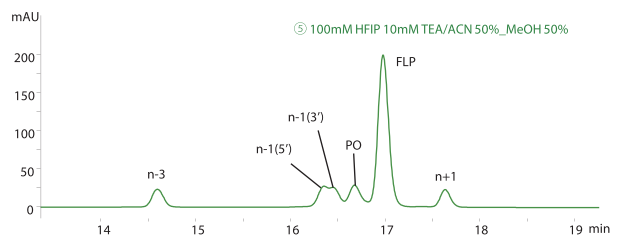


图 4 最高评估值的色谱图 (图 2 ⑤的放大色谱图)

■ 优化阶段

在初筛阶段流动相最佳条件的基础上，通过改变有机溶剂中乙腈比例（40、50和60%）、柱温箱温度（55、60和65℃）和梯度程序初始浓度（6、7和8%）的参数，进一步优化了分离 FLP 和有关杂质的分析条件。所得色谱图如图 5 至 7 所示。结果表明，乙腈比例、柱温箱温度和初始浓度越高，每个峰的分辨率越好。

接下来，为了通过设计空间可视化每个峰的分辨率，通过所有数据跟踪了 FLP 和杂质。

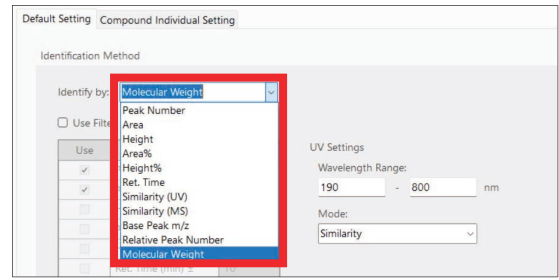


图 8 LabSolutions MD 峰跟踪的参数设置

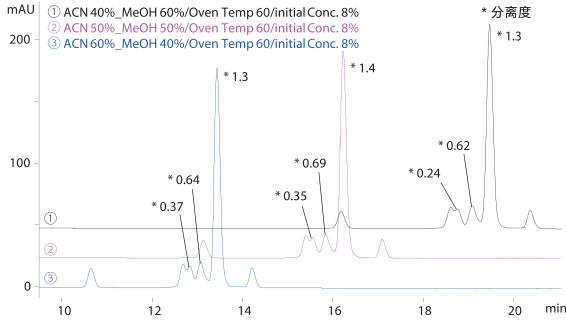


图 5 不同乙腈比 40% (①)、50% (②) 和 60% (③) 的色谱图

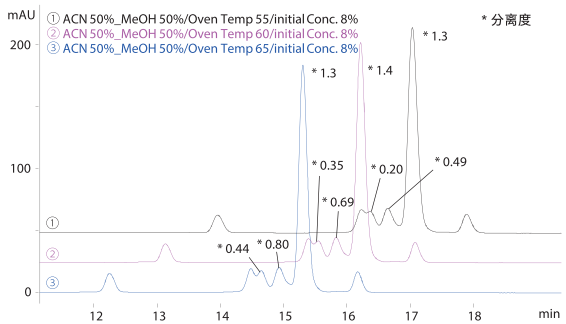


图 6 不同柱温箱温度 55°C (①)、60°C (②) 和 65°C (③) 的色谱图

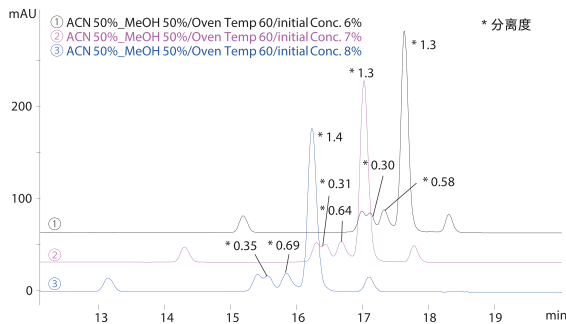


图 7 不同初始浓度 6% (①)、7% (②) 和 8% (③) 的色谱图

■ LCMS-2050 自动峰值跟踪

LabSolutions MD 只需在下拉列表（图 8 中的红色方块）中选择用于跟踪的参数，即可自动识别和跟踪所有数据中的每个峰。即使保留时间随不同 LC 参数而变化，LabSolutions MD 也可以利用多个参数（如峰的洗脱顺序、峰面积、分子量（通过质谱解卷积估算）等）来准确跟踪峰。该功能通过降低峰值跟踪过程中的人为错误风险，极大地提高了操作效率。

图 9 显示了在柱温箱温度为 60°C、梯度程序初始浓度为 8%、乙腈比为 50% 和 60% 时获得的液相色谱图，以及 FLP 和杂质的分子量。图 10 显示了每种杂质的 UV 光谱。FLP、n-3、n-1 (5')、n-1 (3')、PO 和 n+1 的紫外光谱之间的相似性大于 0.99 或以上，这表明基于 UV 光谱的峰追踪很困难。相比之下，LabSolutions MD 能够根据 LCMS-2050 获得的分子量进行峰追踪，从而准确识别 UV 光谱相似的化合物（图 9）。估计分子量为 FLP: 7167（理论分子量: 7168）；n-3: 5985（理论分子量: 5986）；n-1 (5') : 6772（理论分子量: 6774）；n-1 (3') : 6773（理论分子量: 6775）；PO: 7151（理论: 7152）；以及 n+1: 7561（理论分子量: 7563）。这些结果显示与理论值的质量误差较小，表明 LCMS-2050 能够实现精确的峰跟踪。通过对质谱解卷积，可以很容易地估计分子量。这可以用来确定已知化合物的分子量，也可以用来近似估计未知杂质的分子量。

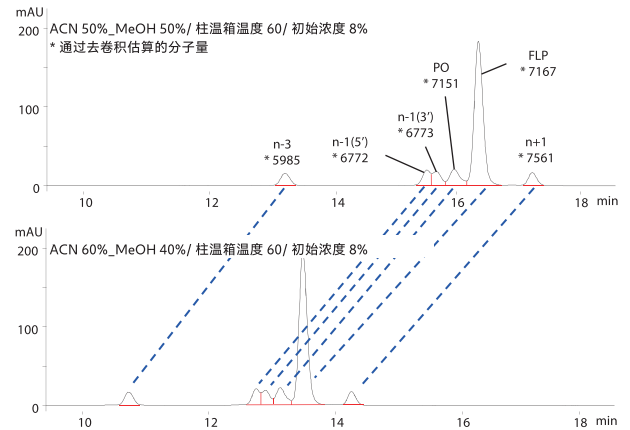


图 9 柱温箱温度为 60°C，初始浓度为 8%，乙腈比例为 50%（上图）60%（下图）时的液相色谱图（虚线表示基于分子量的跟踪）

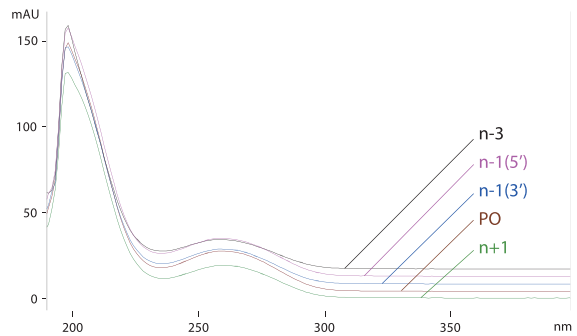


图 10 杂质的 UV 光谱

接下来，通过设计用空间可视化 FLP 和每种杂质的分离度，研究提供最佳分离度和稳定性的最佳条件。

最佳条件的设计空间评估

显示了 FLP 和各杂质分离度的设计空间 (图 11)。竖线表示乙腈比率, 横线表示柱温箱温度。红色区域表示分离度较高, 蓝色区域表示分离度较低。通过设计空间可视化分离度, 很明显柱温箱温度越高, 每个峰的分度越好, 而最佳乙腈比例与化合物相关。

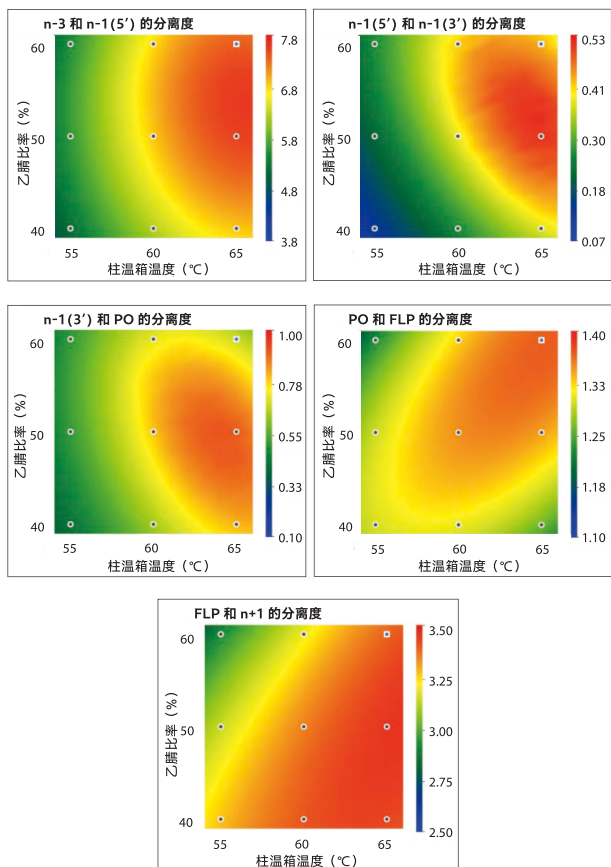


图 11 FLP 和有关杂质分离度的设计空间 (初始浓度为 8%)。

LabSolutions MD 可通过叠加设计空间, 自动检索满足多项标准的最佳条件。例如, 图 12 显示了在 $n-1(3')$ 和 $PO > 0.7$ 的分度以及最后洗脱峰 ($n+1$) 的保留时间 < 16 分钟条件下, 使 $n-1(5')$ 和 $n-1(3')$ 的分度最大化的分析条件区域。绿线包围的区域是 $n-1(3')$ 和 $PO < 0.7$ 的分度, 橙线包围的区域是最后一个洗脱峰 ($n+1$) > 16 分钟的保留时间, 其余区域 (黑色阴影所示) 中的点 A (红色圆圈中) 为自动检索的条件, 可提供 $n-1(5')$ 和 $n-1(3')$ 的最大分度。通过叠加分离度和最后一个洗脱峰的 RT 的设计空间, 可以很容易地找到提供足够分离度和较短分析时间的最佳条件。

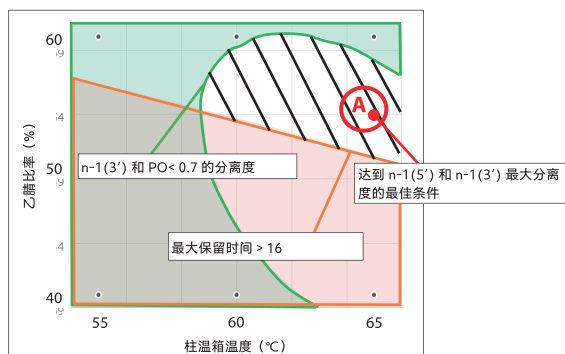


图 12 分离度和最后一个洗脱峰保留时间的设计空间的叠加

最佳条件下的色谱图

在最佳条件下得到的色谱图 (A 点) 如图 13 所示。结果表明, $n-1(3')$ 和 PO 的分度 > 0.7 , 最后一个洗脱峰 ($n+1$) 的保留时间 < 16 , 成功满足优化标准。由于 $n-1(5')$ 和 $n-1(3')$ 的结构非常相似, 因此很难在它们之间实现基线分离, 但 LabSolutions MD 可以最大限度地提高分度, 而无需依赖用户的经验。

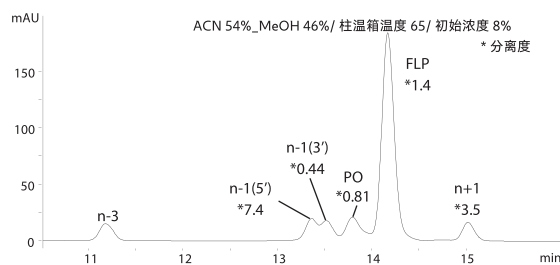


图 13 最佳条件下的色谱图 (100 mmol/L HFIP 和 10 mmol/L TEA)

结论

寡核苷酸的分离效果不同, 具体取决于 HFIP 和 TEA 在含水流动相中的浓度、乙腈和甲醇在有机溶剂中的比率以及柱温箱温度和梯度程序的初始浓度。根据寡核苷酸的结构, 例如长度、碱基和修饰的存在, 分离行为会有所不同。因此, 必须要单独优化每个寡核苷酸序列的分离。另一方面, 为优化分析条件而进行的大量分析和数据处理是一项耗时的挑战。LabSolutions MD 具有特定的功能, 如自动峰跟踪、按评估值对色谱图进行排序和设计空间, 可实现整个工作流程的自动化, 包括分析方法的生成、流动相的制备和数据处理, 这得益于特定的功能。如本文所述, LabSolutions MD、Nexera XS 惰性气体、Shim-pack Scepter Claris 和 LCMS-2050 的组合极大地提高了寡核苷酸方法开发的整体工作流程的效率。

致谢

本研究得到了 AMED 的支持, 资助编号为 JP21ae01-21022、JP21ae0121023、JP21ae0121024 (项目负责人: Satoshi Obika)。

岛津应用云



LabSolutions、Nexera、Shim-pack Scepter 和 DUIS 是 Shimadzu Corporation 或其附属公司在日本和 / 或其他国家的商标。



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: 2024 年 9 月