

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

细井 千寻、铃木 里沙

特点描述

- ◆ 可以碱基为单位分离短链寡核苷酸，展现良好重现性。
- ◆ 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。
- ◆ 通过管理流动相的 pH 变化，可获得稳定的分析结果。

前言

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。

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。

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、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。

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 1 寡核苷酸样品

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

表 2 分析条件

系统	: Nexera XS inert
色谱柱	: Shim-pac™ Bio IEX Q-NPK (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

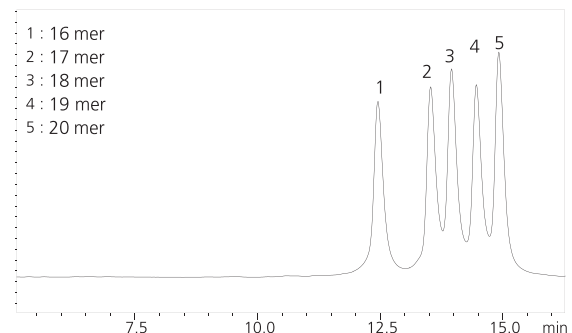


图 1 寡核苷酸混合样品的色谱图

表 3 各成分相对标准偏差 (%RSD, n=6)

长度(mer)	保留时间	峰面积
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

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 μmol/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。

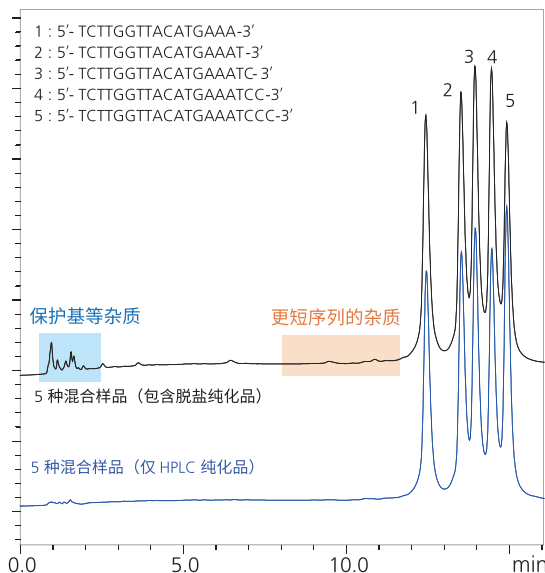


图 2 包含杂质的寡核苷酸混合样品的色谱图

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。

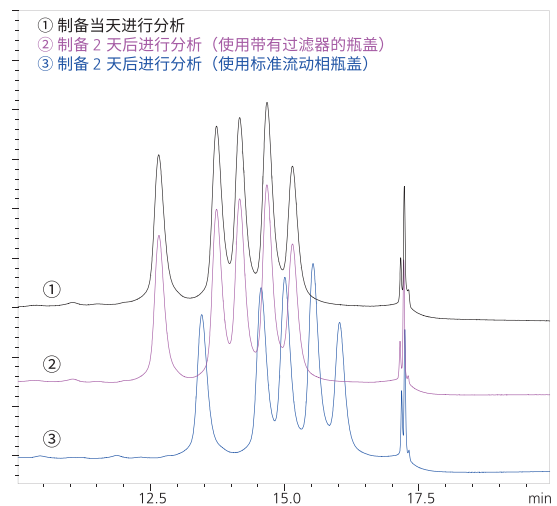


图 3 流动相制备当天及 2 天后寡核苷酸混合样品的色谱图

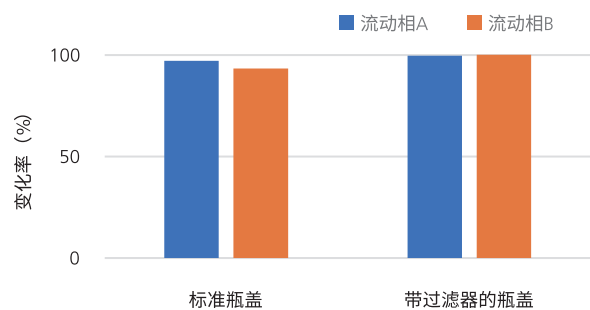


图 4 相比流动相制备当天，制备 2 天后的 pH 变化率

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。

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。



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。

岛津应用云

