

## 超临界流体色谱法分析脱氨基寡核苷酸

Momoka Hayashida



### ■ 摘要

超临界流体色谱法 (SFC) 因采用非极性超临界二氧化碳作为流动相, 长期以来被认为难以应用于高极性化合物寡核苷酸的分离分析。然而, 先前一项研究<sup>1)</sup>发现 4 聚体 DNA 可应用于 SFC。本研究探讨了 SFC 在 4 聚体以上寡核苷酸中的适用性。此外, 为评估 SFC 的分离行为, 我们将其应用于脱氨基寡核苷酸的分离, 这类物质即使采用现有的离子对反相色谱法 (IP-RPLC) 也难以实现有效分离。考虑到 SFC 将用于寡核苷酸合成后的纯化过程, 我们分别采用带有二甲氧基三苯甲基 (DMTr) 保护基团和未带保护基团的序列作为样品。

采用含辛胺的优化改性剂, 检测到 18 聚体修饰寡核苷酸。通过对脱氨基寡核苷酸分离分析条件的优化, 成功实现了 10 聚体和 18 聚体目标寡核苷酸及其脱氨基产物的分离。

本文基于《色谱 A 杂志》(开放获取版) 上发表的原始论文<sup>2)</sup>进行了重写。

### 1. 引言

寡核苷酸治疗药物是一种新型药物形式, 其活性药物成分为寡核苷酸。这些寡核苷酸主要通过亚磷酰胺固相合成法生产 (图 1)。在该合成过程中, 核苷酸主要通过亚磷酰胺的偶联反应从 3' 端至 5' 端逐个添加到延伸链上 (图 1-1、2)。

在偶联过程中, 序列的 5' 位由 4,4'-二甲氧基三苯甲基 (DMTr) 基团保护, 而未参与偶联的序列 5' 位则用乙酰基封端以终止进一步反应 (图 1-4)。当下一个碱基偶联时, DMTr 基团被脱保护 (图 1-5), 随后下一个亚磷酰胺单体被偶联 (图 1-2)。通过重复这一过程, 可以合成任意序列。完成全长延伸后, 寡核苷酸从固相载体上切割下来, 并通过以下两种方法之一进行纯化 (图 2): 第一, 保留 DMTr 保护基团 (DMTr-on) 的寡核苷酸从固相载体上切割后, 采用液相色谱法 (LC) 纯化; 第二, 先在固相载体上去除寡核苷酸的 DMTr 保护基团 (DMTr-off), 再进行切割并采用 LC 纯化。

无论采用哪种纯化方法, 都难以完全去除合成过程中产生的多种杂质, 因此进行杂质分析至关重要。例如, 脱氨基寡核苷酸是一种杂质, 其胞嘧啶碱基的氨基主要在切割和脱保护过程中因碱性条件而被羟基取代。脱氨基胞嘧啶会被识别为尿嘧啶, 可能导致脱靶效应。IP-RPLC 常被用作分离方法, 但由于目标物与脱氨产物的极性相近, 即使采用 IP-RPLC 也可能因序列差异而难以实现有效分离。

SFC 是一种以加压二氧化碳作为主要流动相的分析技术, 其黏度低于常规液体流动相而扩散性更高, 因而具有优异的分离性能。

SFC 也适用于制备应用，因其易于放大至制备规模，且收集的馏分通常几乎全为有机溶剂，便于后续处理。

由于加压二氧化碳的低极性，SFC 曾被认为难以分析高极性化合物，但通过对共溶剂（改性剂）组成及其与二氧化碳混合比例的优化，现已可应用于高极性化合物的分析<sup>3)</sup>。在我们之前的研究<sup>1)</sup>中，使用含有 2-氨基乙醇的改性剂对 4 聚体寡核苷酸进行了分析。然而，高极性序列观察到峰拖尾现象，这表明必须进一步优化分析条件才能将该方法应用于高极性序列的分析。因此，考虑通过向改性剂中添加辛胺（一种高疏水性烷基胺）来改善峰形——辛胺能形成更多疏水性离子对，从而提高寡核苷酸在流动相中的溶解度。

本研究考察了改性剂的组成，以评估 SFC 是否可应用于 5、10、15 和 18 聚体序列的分析。同时，采用 SFC 对脱氨基序列进行分离，以评估其分离能力。考虑到疏水性更强的 DMTr 基团可能更易于分析，因此采用 DMTr-on 和 DMTr-off 序列进行评估，同时考察了这些序列在保留行为上的差异。

## 2. 实验部分

SFC 与 IP-RPLC 的分析条件如表 2-6 所示。由于前期实验表明，添加 40 mmol/L 及以上浓度的 2-氨基乙醇可获得良好的峰形，因此本研究将 2-氨基乙醇的浓度固定为 50 mmol/L。向改性剂中添加相同浓度的乙酸以中和其 pH 值。采用与先前研究相同的 Shim-pack Diol II 色谱柱（以下简称 Diol II 色谱柱）。

MS 条件如表 1 所示。

表1 MS条件

系统	: LCMS-9030
采集模式	: 负离子
接口温度	: 350 °C
雾化气	: 3.0 L/min
加热气流速	: 10.0 L/min
干燥气流速	: 10.0 L/min
DL 温度	: 250 °C
加热模块温度	: 400 °C
接口电压	: -3.5 kV
TOF-MS	: $m/z$ 150-2000

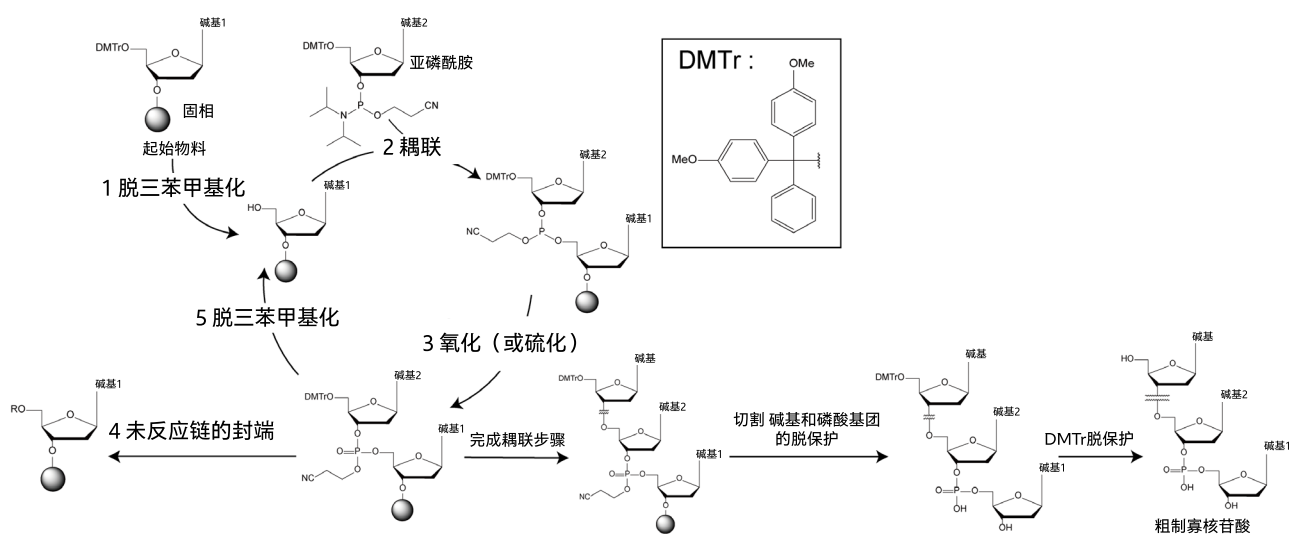


图1 亚磷酸胺法

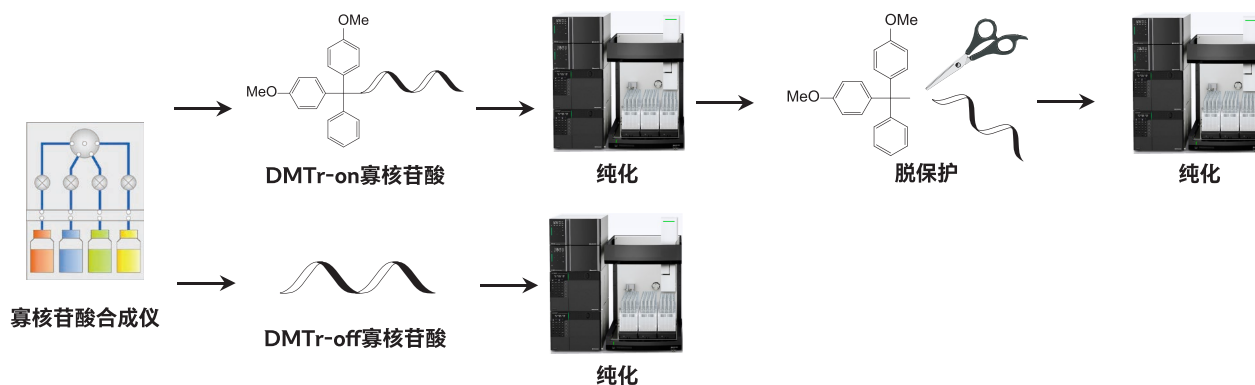


图2 固相合成纯化方法

### 3. 结果和讨论

#### 3-1. SFC 在 10、15、18 聚体寡核苷酸中的适用性评估

首先，通过使用含有 2-氨基乙醇（该试剂用于前期研究<sup>1)</sup>）或高疏水性辛胺的改性剂，对 5、10、15 和 18 聚体 DNA 进行分析（图 3），评估了 SFC 对长链寡核苷酸的适用性（图 4）。使用 2-氨基乙醇时，确认了 5 聚体峰的洗脱，但未观察到 10、15 和 18 聚体峰的洗脱。使用辛胺时，确认了 5 和 10 聚体峰，但未观察到 15 和 18 聚体峰。这表明辛胺能够分析更长的寡核苷酸。随后对经过 2'-O-甲氧乙基（2'-MOE）RNA 修饰（图 3）且胞嘧啶被 5-甲基胞嘧啶取代的序列进行 SFC 分析，以评估这些修饰对保留行为和峰形的影响。使用辛胺时，洗脱出 5、10、15 和 18 聚体峰。这表明 SFC 对 2'-MOE 修饰的寡核苷酸的适用性优于 DNA。在我们之前的研究中，已证实寡核苷酸的保留时间取决于碱基类型决定的序列极性<sup>1)</sup>。

然而，DNA 与 2'-MOE 修饰的寡核苷酸在极性上并无显著差异，且对除 2'-MOE 外的其他修饰序列进行分析时，其保留时间与序列极性并不匹配。这表明糖基部分的保留机制与碱基部分不同。需进一步研究以明确哪些序列可通过 SFC 进行分析。然而据我们所知，这是首次采用 SFC 分析长度超过 10 聚体的较长寡核苷酸。

表 2 图 4 的分析条件

系统	: Nexera™ UC
色谱柱	: Shim-pack™ UC-Diol II (150 mm×4.6 mm I.D., 3 μm <sup>1)</sup> )
柱温箱温度	: 35 °C
进样量	: 1 μL 100 μmol/L 寡核苷酸溶于甲醇与水的混合液 (95:5, v/v)
流动相	: A) scCO <sub>2</sub> B) 50 mmol/L 2-氨基乙醇 / 辛胺与 50 mmol/L 乙酸溶于甲醇和水的混合液 (95:5, v/v)
B 相浓度	: 20% (0–2 min), 20–60% (2–20 min), 60% (20–24 min), 60–20% (24–25 min), 20% (25–30 min)
流速	: 1.0 mL/min
背压	: 10 MPa, 50 °C
检测	: MS (表 1)

\*1 定制

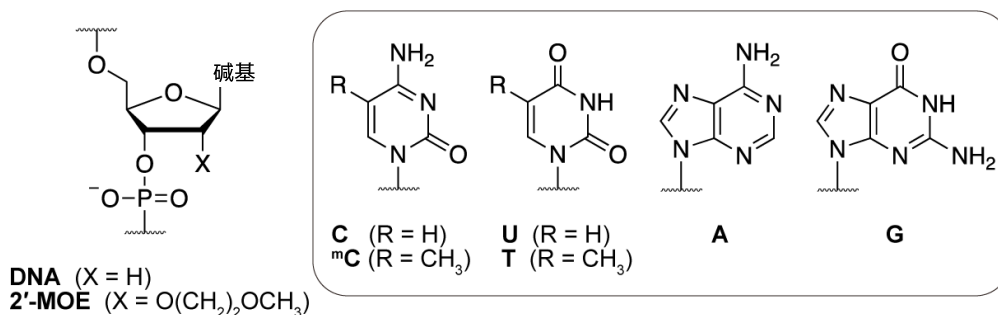


图 3 DNA 和 2'-MOE 修饰寡核苷酸的结构

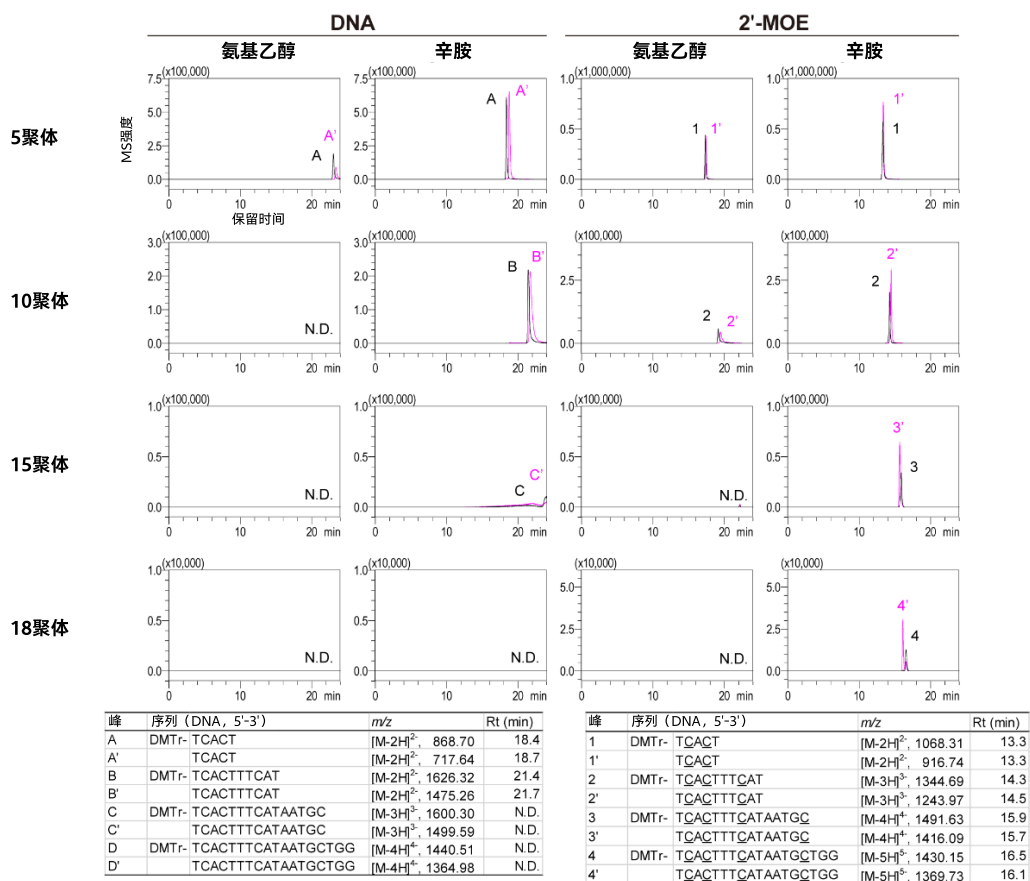


图 4 5、10、15、18 聚体 DNA 及 2'-MOE 修饰寡核苷酸的提取离子色谱图 (EIC)

### 3-2. 脱氨寡核苷酸与目标寡核苷酸分离的分析条件优化

为评估脱氨寡核苷酸在 SFC 中的分离性能，采用 2'-MOE 修饰的寡核苷酸及其脱氨基序列，考察了柱温箱温度与改性剂添加剂类型的影响。评估中使用了 18 聚体（寡核苷酸治疗药物中采用的碱基长度）和 10 聚体（约为寡核苷酸治疗药物碱基长度的一半）。此处仅使用 DMTr-on 序列，因为 DMTr-on 与 DMTr-off 序列的保留时间和峰形大致相同。考察了柱温箱温度，因其是改善 IP-RPLC 中峰形的重要因素（图 5）。10 聚体序列在 35°C 下显示出良好的峰形，并与脱氨基序列完全分离，而 18 聚体序列则出现峰展宽现象，并与脱氨基序列共洗脱。随着温度升高，18 聚体峰的宽度减小，在温度超过 50°C 时实现了与脱氨基序列的完全分离。

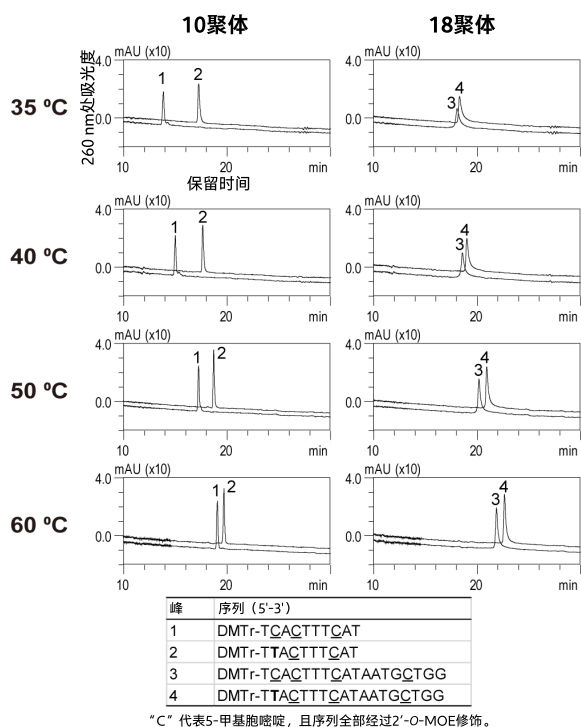


图5 目标序列（峰1和3）与脱氨基序列（峰2和4）在柱温箱温度35、40、50和60°C下的色谱分离情况

表3 图5的分析条件

系统	: Nexera UC
色谱柱	: Shim-pack UC-Diol II (150 mm×4.6 mm I.D., 3 μm <sup>1</sup> )
柱温箱温度	: 35、40、50 和 60°C
进样量	: 1 μL 100 μmol/L 寡核苷酸溶于甲醇与水的混合液 (95:5, v/v)
流动相	: A) scCO <sub>2</sub> B) 50 mmol/L 辛胺和 50 mmol/L 乙酸溶于甲醇 与水的混合液 (95:5, v/v)
B 相浓度	: 30% (0-5 min), 30-60% (5-30 min), 60% (30-35 min), 30% (36-40 min)
流速	: 1.0 mL/min
背压	: 10 MPa, 50 °C
检测	: PDA 260 nm

\*1 定制

这表明柱温箱温度是寡核苷酸及其脱氨基序列分离的关键因素。因此，柱温箱温度设定为 50°C。

随后对烷基胺进行了优化。由于烷基胺的选择对 IP-RPLC 的分离能力影响显著，我们在 SFC 上也进行了相同方式的研究（图 6）。首先，考察了相同碳原子数的伯、仲、叔烷基胺（己胺、二丙胺和三乙胺）。三乙胺为改性剂未出峰，二丙胺为改性剂峰比较宽，己胺为改性剂出尖锐峰。由于己胺是三种烷基胺中疏水性最强的，因此认为烷基胺的疏水性会影响峰形。当使用比己胺疏水性更强的仲胺二丁胺时，检测到一个宽峰，这表明长链伯胺能有效改善峰形。最终，选择持续使用辛胺，因其在所评估的烷基胺中能提供最理想的峰形和最高的分离度。

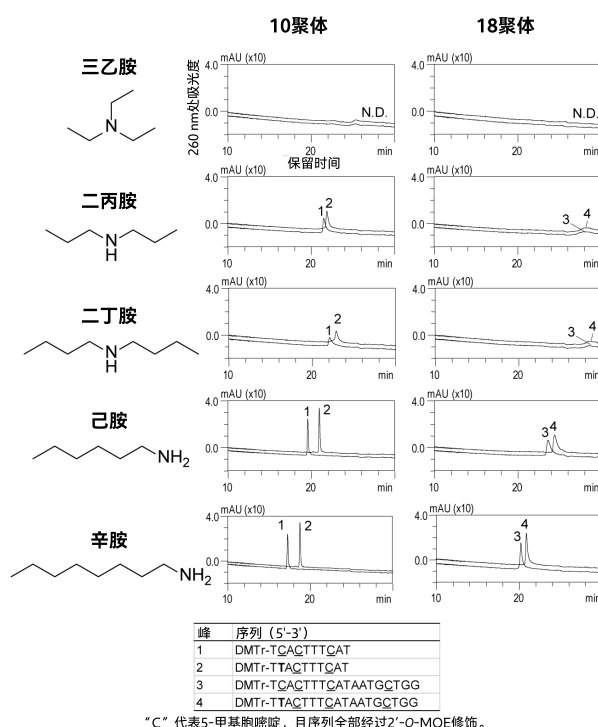


图6 使用不同烷基胺作为改性剂时目标序列（峰1和3）与脱氨基序列（峰2和4）的色谱分离情况

表4 图6的分析条件

系统	: Nexera UC
色谱柱	: Shim-pack UC-Diol II (150 mm×4.6 mm I.D., 3 μm <sup>1</sup> )
柱温箱温度	: 50 °C
进样量	: 1 μL 100 μmol/L 寡核苷酸溶于甲醇与水的混合液 (95:5, v/v)
流动相	: A) scCO <sub>2</sub> B) 50 mmol/L 烷基胺和 50 mmol/L 乙酸溶于甲 醇与水的混合液 (95:5, v/v)
B 相浓度	: 30% (0-5 min), 30-60% (5-30 min), 60% (30-35 min), 30% (36-40 min)
流速	: 1.0 mL/min
背压	: 10 MPa, 50 °C
检测	: PDA 260 nm

\*1 定制

### 3-3. 脱氨寡核苷酸分离行为评估

最后，比较了 SFC 与 IP-RPLC 对目标序列及其脱氨基序列的分离性能。由于梯度洗脱曲线似乎对两种分离模式的保留时间影响不均等，因此 SFC 和 IP-RPLC 均采用等度洗脱。据报道，丙胺在 IP-RPLC 中能更有效分离脱氨基寡核苷酸，因此被用作离子对试剂<sup>4)</sup>。所有序列的分析均设定在 15 分钟内洗脱完成。对于 DMT-on 10 聚体和 18 聚体序列，通过 SFC 成功分离了与目标寡核苷酸发生不同数量脱氨基反应的序列（图 7）。IP-RPLC 同样以相同方式分离了样品，但 SFC 的分离效果优于 IP-RPLC。

DMTr-off 10 聚体和 18 聚体的目标寡核苷酸及其脱氨基序列均可通过 SFC 实现分离。结果表明，寡核苷酸与色谱柱的相互作用比 DMTr 基团更强，因为 DMTr-on 和 DMTr-off 序列的洗脱保留时间大致相同（图 8）。IP-RPLC 也能分离 DMTr-off 10 聚体和 18 聚体寡核苷酸及其脱氨基序列，且分离效果优于 SFC。在使用 IP-RPLC 分析 DMTr-on 序列时，疏水性 DMTr 基团对保留的贡献似乎较大，而亲水性碱基对保留的贡献则显得较小。另一方面，DMTr-off 序列并未显著增加疏水性官能团的数量。因此，可基于识别碱基差异实现这些序列的分离。

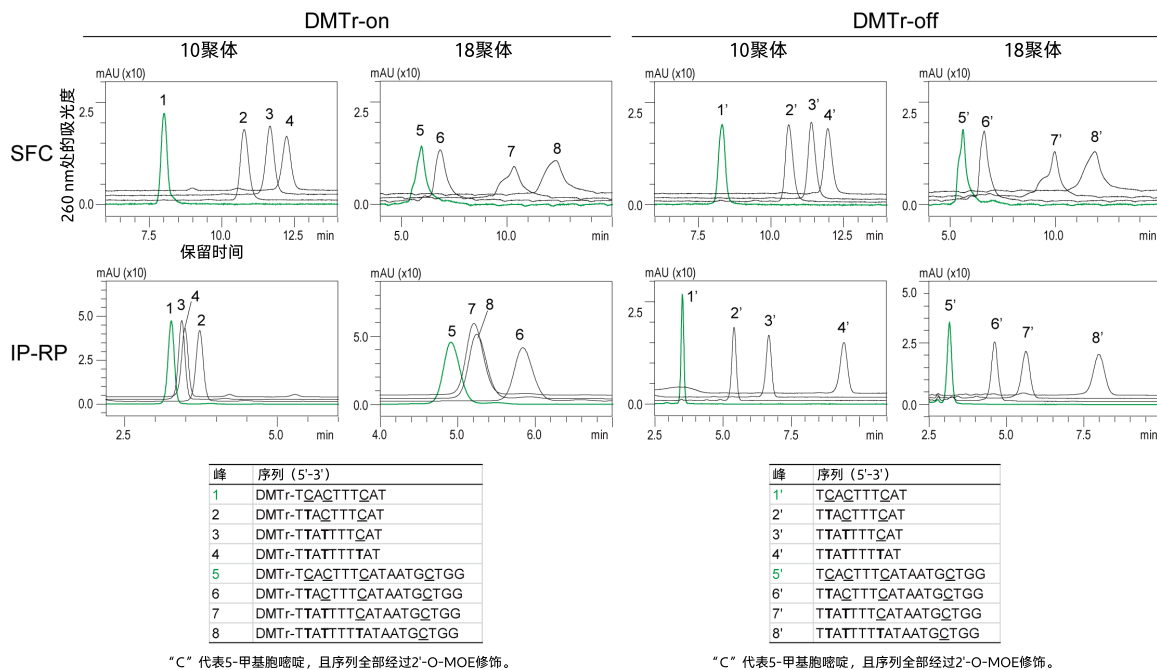


图7 采用SFC和IP-RPLC对目标序列与脱氨基序列的色谱分离情况  
目标序列（峰1、5、1'和5'，绿线）及其对应的脱氨基序列（峰2-4、6-8、2'-4'和6'-8'，黑线）

表5 图7和图9中SFC的分析条件

系统	: Nexera UC
色谱柱	: Shim-pack UC-Diol II (150 mm×4.6 mm I.D., 3 μm <sup>1)</sup> )
柱温箱温度	: 50 °C
进样量	: 1 μL 100 μmol/L 寡核苷酸溶于甲醇与水的混合液 (95:5, v/v)
流动相	: A) scCO <sub>2</sub> B) 50 mmol/L 辛胺和 50 mmol/L 乙酸溶于甲醇 与水的混合液 (95:5, v/v)
B 相浓度	: 40% (DMTr-on 和 DMTr-off 10 聚体) , 45% (DMTr-on 和 DMTr-off 18 聚体)
流速	: 1.0 mL/min
背压	: 10 MPa, 50 °C
检测	: PDA 260 nm

表6 图7和图9中IP-RPLC的分析条件

系统	: Nexera XS
色谱柱	: Shim-pack Scepter C18-120 (150 mm×4.6 mm I.D., 3 μm <sup>1)</sup> )
柱温箱温度	: 50 °C
进样量	: 1 μL 100 μmol/L 寡核苷酸溶于甲醇与水的混合液 (95:5, v/v)
流动相	: A) 10 mmol/L 丙胺水溶液 (pH 9.6, 用乙酸调节) B) 乙腈
B 相浓度	: 30% (0-5 min) , 30-60% (5-30 min) , 60% (30-35 min) , 30% (36-40 min)
流速	: 1.0 mL/min
背压	: 10 MPa, 50 °C
检测	: PDA 260 nm

\*1 P/N 227-31016-05

\*1 定制

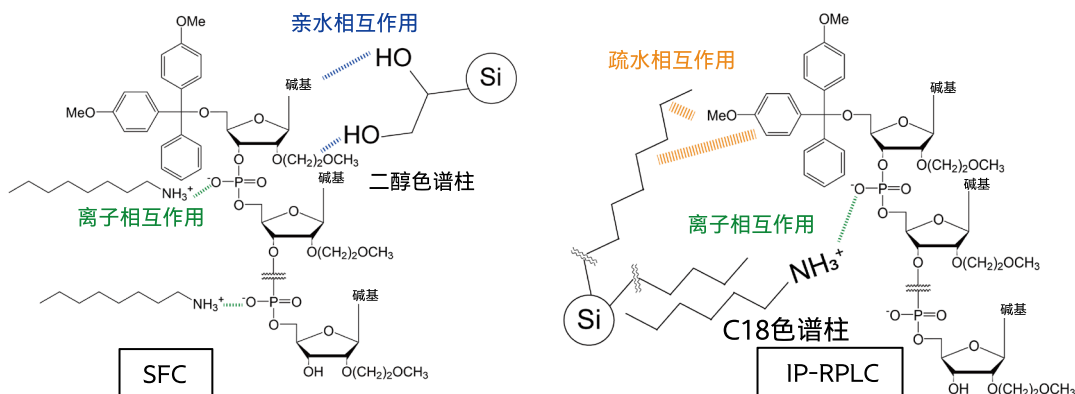


图8 SFC与IP-RPLC的保留机制推测

随后，研究了目标寡核苷酸与不同脱氨基位点序列的分离情况（图9）。对于DMTr-on 10聚体和DMTr-off 10聚体，目标序列能够与脱氨基序列分离。在IP-RPLC分析中，部分脱氨基序列与DMTr-on 10聚体成功分离，但序列d出现了共洗脱现象。IP-RPLC对DMTr-off 10聚体和18聚体序列均展现出优异的分​​离效果。这些结果表明，SFC与IP-RPLC在寡核苷酸分析中呈现出不同的保留行为。

#### 4. 结论

本研究评估了采用SFC分析DMTr-on与DMTr-off 5、10、15和18聚体序列的可行性，发现通过含辛胺改性剂可实现2'-MOE修饰序列的有效分析。若要将该方法应用于所有寡核苷酸治疗药物中涉及的序列，仍需开展进一步研究。例如，研究还证实，硫代磷酸酯（PS）修饰序列——寡核苷酸治疗药物的典型修饰——在SFC分析中因非对映异构体分离不完全，会导致峰形显著展宽<sup>5)</sup>。由于序列中PS修饰数量可能导致无法获得理想分离效果，优化分析条件至关重要。

此外，本研究还评估了采用SFC分析DMTr-on 10聚体和18聚体、DMTr-off 10聚体和18聚体及其脱氨基序列的可行性，并将结果与现有IP-RPLC分析数据进行了对比。

无论是否含有DMTr基团，SFC中目标序列的保留时间几乎相同，且其脱氨基序列均能与各自的目标序列实现分离。在IP-RPLC中，部分DMTr-on序列中目标序列与脱氨基序列共洗脱，而在DMTr-off序列中，目标序列与脱氨基序列实现了良好分离。这些结果表明，DMTr-on序列可能适用于分离含有高疏水性器官靶向配体以及DMTr基团的杂质序列。

#### 5. 致谢

我们衷心感谢大阪大学药学研究科的Satoshi Obika教授和Takao Yamaguchi教授的悉心指导。

本研究部分由日本医疗研究开发机构（AMED）资助，资助编号为JP21ae0121022、JP21ae0121023、JP21ae0121024（项目负责人：Satoshi Obika）。

< 参考文献 >

- 1) M. Hayashida et al., *J. Chromatogr. A*, **2023**, 1708, 464333, DOI: [10.1016/j.chroma.2023.464333](https://doi.org/10.1016/j.chroma.2023.464333)
- 2) M. Hayashida et al., *J. Chromatogr. A*, **2025**, 1744, 465731, DOI: [10.1016/j.chroma.2025.465731](https://doi.org/10.1016/j.chroma.2025.465731)
- 3) J. Molineau et al., *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **2021**, 193, 113736, DOI: [10.1016/j.jpba.2020.113736](https://doi.org/10.1016/j.jpba.2020.113736)
- 4) S. G. Roussis et al., *J. Chromatogr. A*, **2019**, 1594, 105-111, DOI: [10.1016/j.chroma.2019.02.026](https://doi.org/10.1016/j.chroma.2019.02.026)
- 5) M. Hayashida, **2024**, doctoral dissertation of Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Osaka University, URL: <https://hdl.handle.net/11094/96135>

< 相关应用 >

超临界流体色谱法分析短链寡核苷酸 [应用说明第 100 号](#)

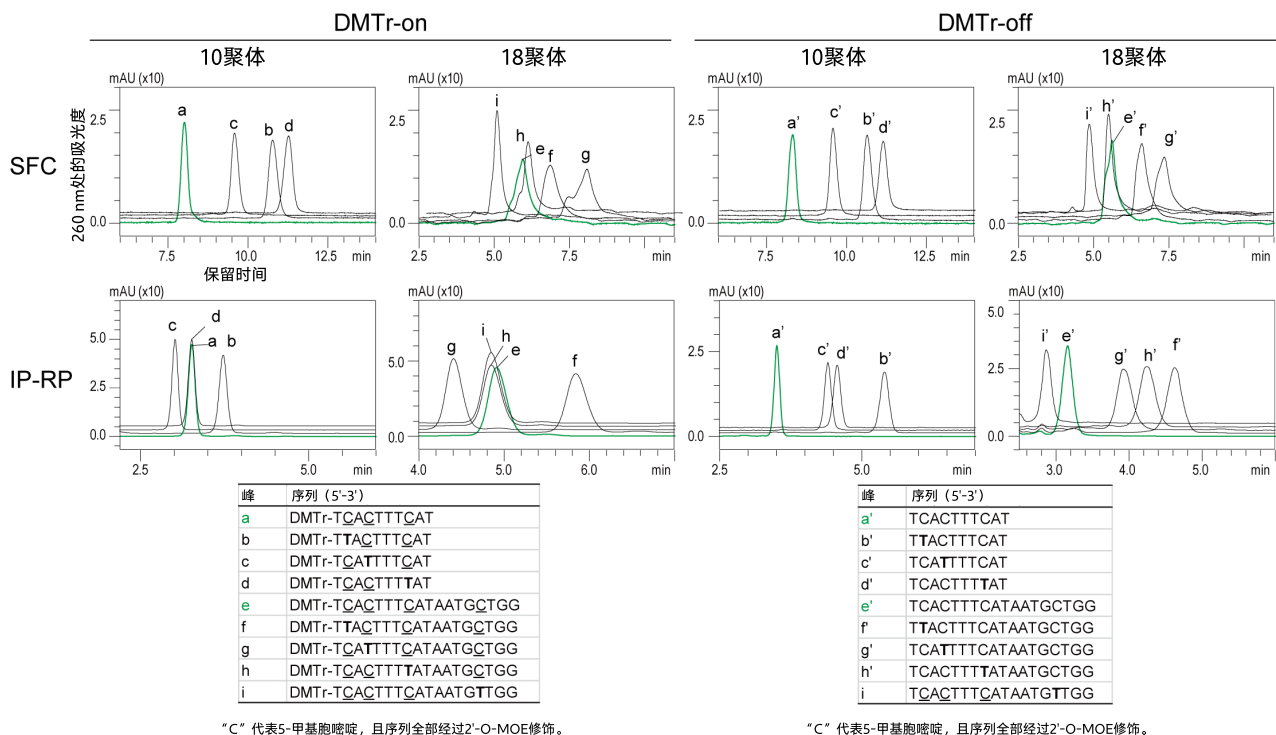


图9 采用SFC和IP-RPLC对目标序列与脱氨基序列的色谱分离情况  
目标序列（峰a、e、a'和e'，绿线）及其对应的脱氨基序列（峰b-d、f-i、b'-d'和f'-i'，黑线）

岛津应用云



Nexera 和 Shim-pack 是岛津制作所或其附属公司在日本和 / 或其他国家 / 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：2025年5月

> 请填写调查问卷

## 相关产品 某些产品可能更新为更新的型号。



### > Nexera UC

超临界流体萃取/超临界流体...

## 相关解决方案

> 制药与生物制药

> 寡核苷酸与mRNA  
治疗药物

> 价格咨询

> 产品咨询

> 技术服务/支持咨询

> 其他咨询