

超临界流体色谱法分析短链寡核苷酸

Momoka Hayashida



■ 摘要

评估了超临界流体色谱法 (SFC) 在寡核苷酸杂质分析中的适用性。本研究证明, 通过优化分析条件可对 4 聚体寡核苷酸进行分析。通过对比研究发现, 采用含 2-氨基乙醇乙酸的甲醇-水混合溶液作为改性剂(共溶剂), 并搭配 Shim-pack™ UC-Diol II 色谱柱, 可实现不同硫代磷酸酯修饰量的 4 聚体寡核苷酸分离。这些结果表明该方法适用于寡核苷酸分析。

本文基于发表于《色谱学杂志 A》的原始文章¹⁾撰写。

1. 引言

寡核苷酸治疗药物是以寡核苷酸为活性成分的药物。寡核苷酸治疗药物通过化学合成生产, 但在此过程中会产生杂质, 因此需要对杂质进行测量和表征。目前, 反相离子对色谱法常用于此类分析, 但难以分离与目标产物结构相似的部分杂质。因此, 需要一种与现有方法选择性不同的分离方法。

SFC 是一种在高于临界温度和压力条件下, 以二氧化碳为流动相的分析方法。据报道, 与液体相比, 二氧化碳作为 SFC 流动相组分具有低粘度和高扩散性, 因此具备高分离度和特殊选择性。

另一方面, 由于含二氧化碳的流动相极性较低, SFC 被认为不适合分析高极性化合物。然而近年来, 通过调整二氧化碳混合改性剂的配比及优化固定相选择, 现已能够实现对肽类、核苷酸等高极性化合物的分析²⁾。

本研究评估了 SFC 在寡核苷酸分析中的适用性。20 聚体左右的单链寡核苷酸常被用作寡核苷酸治疗药物, 但由于分子极性极高且分析难度大, 我们首先采用 4 聚体寡核苷酸进行评估, 探究其基本保留行为。

2. 实验部分

本研究重点探讨了不同硫代磷酸酯 (PS) 含量寡核苷酸的分离方法。PS 修饰是指寡核苷酸磷酸部分的一个氧原子被硫原子取代, 该技术已应用于多种商业药物 (图 1)。分离具有不同 PS 含量的寡核苷酸序列对质量控制至关重要, 因为含 PS 修饰的寡核苷酸合成过程中会产生硫原子被氧原子取代的杂质。为通过 SFC 分离不同 PS 含量的 4 聚体寡核苷酸, 我们分三步建立了分析方法: (1) 洗脱条件验证, (2) 固定相分离性能评估 (3) 流动相中改性剂添加剂的优化。最后, 我们研究了可应用该分析方法的寡核苷酸序列及其基本保留特性。

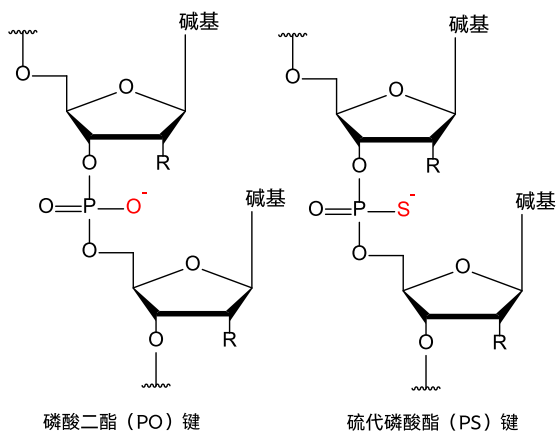


图1 寡核苷酸的磷酸结构

质谱仪 (MS) 的检测条件见表 1; SFC 分析条件见正文说明。

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
加热的流速	: 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
MS 扫描范围	: m/z 150-2000

表2 图2的分析条件

系统	: Nexera™ UC
色谱柱	: Shim-pack UC-GIS II/RP/ 苯基 /CN/Diol II/ 酰胺 (150 mm × 4.6 mm 内径, 3 μm)
温度	: 35 °C
进样量	: 5 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 ₂ , B) 改性剂, A/B=20:80
流速	: 1.0 mL/min
背压	: 10 MPa, 50 °C
检测	: MS (表 1)

3. 结果和讨论

3-1. 洗脱条件研究

考虑到寡核苷酸因其高极性可能无法从色谱柱中洗脱, 我们首先使用三种不同改性剂对 4 聚体寡胸苷酸 T4 进行了洗脱验证 (图 2)。我们使用了与 LC 条件相似的 80% 改性剂 (表 2), 并选用了从低极性到极性官能团的多种固定相。选择对寡核苷酸具有高溶解度的甲醇作为改性剂的基础溶剂。使用甲醇或甲醇-水混合液 (95:5) 时未检测到峰 (图 2-A、B), 但在使用含 50 mmol/L 甲酸铵的甲醇-水混合液 (95:5) 时, 六根色谱柱中有五根检测到尖锐峰 (图 2-C)。这表明铵离子对于从色谱柱洗脱寡核苷酸至关重要。经酰胺基团修饰的色谱柱与寡核苷酸产生强相互作用, 阻碍其洗脱, 因此未检测到任何峰信号。因此, 我们使用含 50 mmol/L 甲酸铵的甲醇-水混合液 (95:5) 比较了除酰胺柱外各固定相的分离效率。

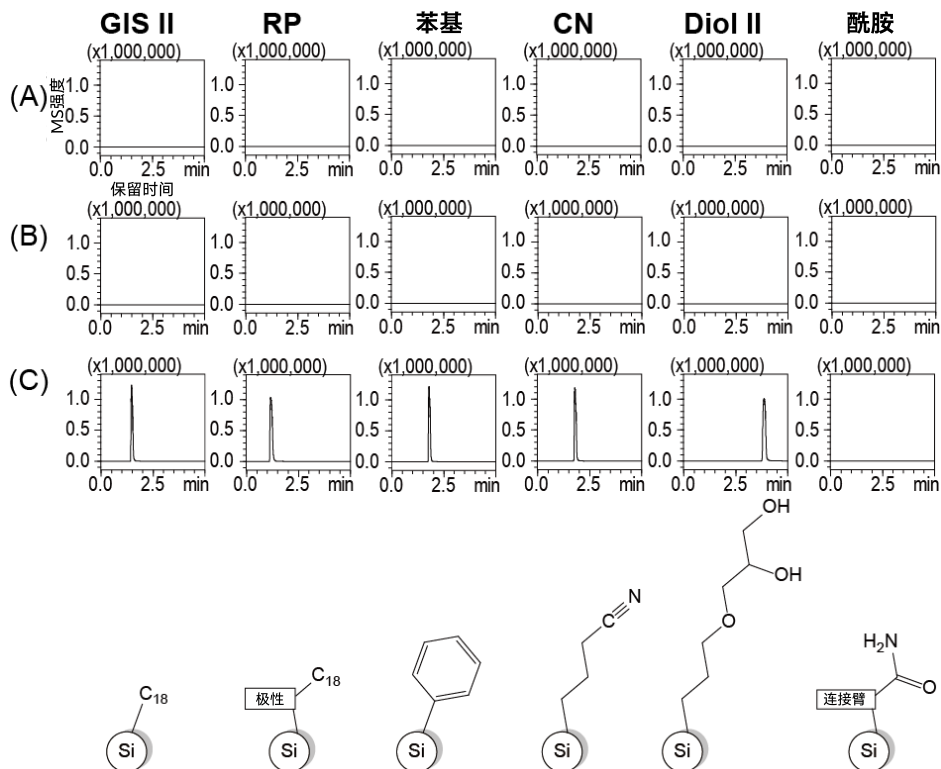


图2 使用三种不同改性剂的T4提取离子色谱图 (m/z 1153.22)

(A) 甲醇, (B) 甲醇-水混合液 (95:5, v/v), 以及 (C) 含50 mmol/L甲酸铵的甲醇-水混合液 (95:5, v/v)

3-2. 固定相分离能力评估

采用 50% 的改性剂比例对不同 PS 含量的 T4 进行分析以增加保留时间 (图 3、表 3)。采用低极性官能团作为固定相的 GIS II、RP 和苯基色谱柱, 所有 T4 均被共洗脱。当进一步降低改性剂比例以延长保留时间时, 保留时间仍然较短且出现拖尾现象, 这强烈表明使用这些色谱柱无法实现完全分离。峰在 CN 柱和 Diol II 柱上实现了分离, 特别是所有序列在 Diol II 柱上达到了完全分离。T4+3PS (图 3 所示序列) 在 80 分钟后洗脱 (数据未显示)。根据这些结果, 我们制备了一根³⁾与 Diol II 柱保留特性相似的色谱柱, 并研究了对分离有效的官能团。

表3 图3的分析条件

系统	: Nexera UC
色谱柱	: Shim-pack UC-GIS II、RP、苯基、CN、Diol II (150 mm × 4.6 mm 内径, 3 μm)
温度	: 35 °C
进样量	: 5 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 ₂ , B) 含 50 mmol/L 甲酸铵的甲醇 - 水混合液 (95:5, v/v), A/B=50:50
流速	: 1.0 mL/min
背压	: 10 MPa, 50 °C
检测	: MS (表 1)

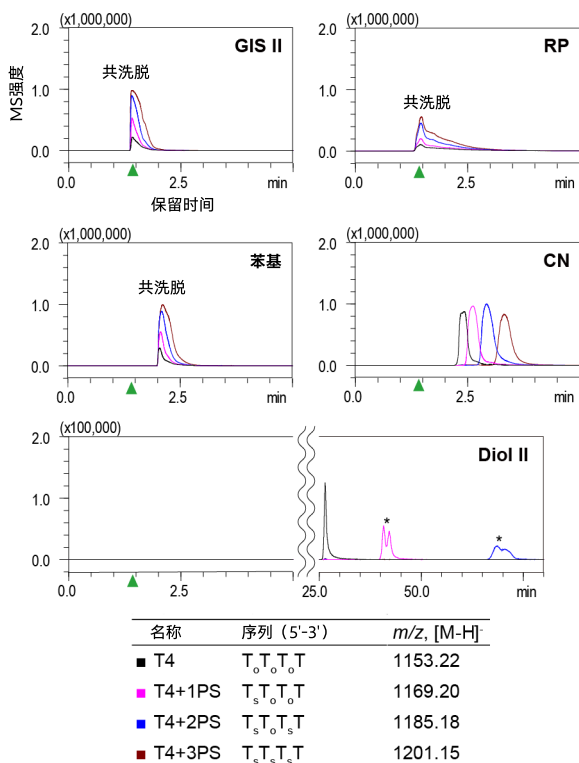


图 3 不同PS含量T4的叠加EIC图

采用七种保留特性与 Diol II 柱相似的色谱柱分析不同 PS 含量的 T4 (图 4、表 4), 这些 T4 在 Diol II、SIL II 和 HyP 色谱柱上实现完全或部分分离; PBT 色谱柱未保留 T4, 而 PVP、Triazole 和 NH₂ 色谱柱未在指定时间内洗脱全部 T4 组分。所有分离不同 PS 含量 T4 的色谱柱均含有羟基, 这表明羟基在分离过程中起重要作用。Diol II 色谱柱的分离效果最佳, 且保留时间随 PS 含量增加而延长 (图 4-Diol II)。

通常而言, 二醇柱基于亲水相互作用呈现保留行为; 由于 PO 键比 PS 键极性更强, 所有含 PO 键的序列都应被强保留, 但实际观察到的却是相反的洗脱顺序。这表明 Diol II 色谱柱对 PS 键具有特殊的选择性。根据上述结果, 我们选用 Diol II 色谱柱作为分离柱。

表4 图4的分析条件

系统	: Nexera UC
色谱柱	: Shim-pack UC-Diol II、SIL II、HyP、Triazole 及 NH ₂ (150 mm × 2.1 mm 内径, 3 μm) Shim-pack UC-PBT 和 PolyVP (150 mm × 3.0 mm 内径, 3 μm)
温度	: 35 °C
进样量	: 5 μL
流动相	: A) scCO ₂ , B) 含 50 mmol/L 甲酸铵的甲醇 - 水混合液 (95:5, v/v), A/B=50:50
流速	: 1.0 mL/min
检测	: MS (表 1)

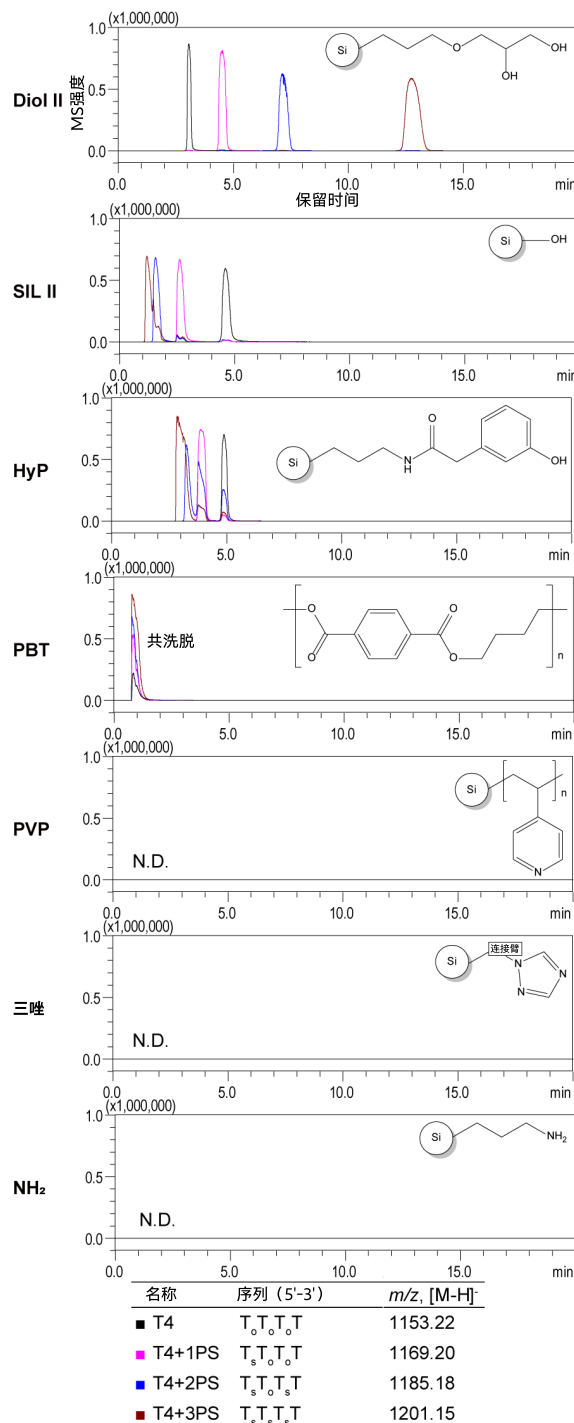


图 4 不同PS含量T4的叠加EIC图

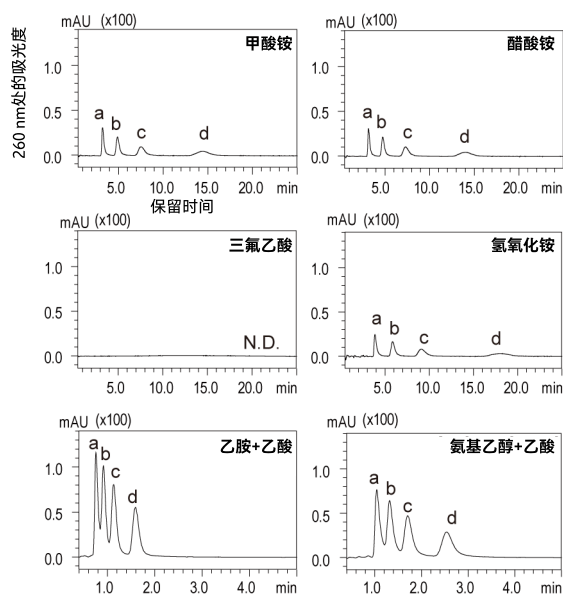
3-3. 适用于高极性序列的改性剂条件研究

胸腺嘧啶在核碱基中极性较低，易于通过 SFC 进行分析。因此，当将 SFC 方法应用于极性及复杂度高于 T4 (5'-TAGC-3') 的序列时，观察到明显的峰拖尾现象，故对改性剂添加剂进行了研究 (图 5、表 5)。实验中使用了乙酸铵和氢氧化铵，但峰拖尾现象未见改善；而加入三氟乙酸后，寡核苷酸未能洗脱，也未检测到色谱峰。随后我们将注意力转向反相 HPLC 中使用的离子对试剂，当采用乙胺和氨基乙醇时，峰形得到改善。

据推测，这是由于寡核苷酸磷酸基团部分形成了离子对，降低了分子的极性，从而增强了其与流动相的亲合力。该结果表明，离子对试剂在将 SFC 应用于高极性寡核苷酸序列时具有显著效果。

表5 图5的分析条件

系统	: Nexera UC
色谱柱	: Shim-pack UC-Diol II (100 mm × 2.0 mm 内径, 3 μm)
温度	: 35 °C
进样量	: 1 μL
流动相	: A) sc CO ₂ , B) 含 50 mmol/L 或 0.1% (v/v) 添加剂的甲醇 - 水混合液 (95:5, v/v), A/B=50:50
流速	: 1.5 mL/min
检测	: 260 nm (带高压池的 PDA 检测器)



峰	名称	序列 (5'-3')
a	TAGC	T ₀ A ₀ G ₀ C
b	TAGC+1PS	T ₁ A ₀ G ₀ C
c	TAGC+2PS	T ₂ A ₀ G ₀ C
d	TAGC+3PS	T ₃ A ₀ G ₀ C

胸苷 (T)、脱氧腺苷 (A)、脱氧鸟苷 (G)、
脱氧胞苷 (C)、PO键 (°)、PS键 (°)

图5 不同PS含量T4的叠加EIC图

3-4. 应用于不同序列

由于 T4 与 TAGC 之间的峰形变化显著，共分析了 14 种不同碱基序列的寡核苷酸 (均为 PO 键连接)，并比较了它们的峰形 (图 6、表 6)。根据改性盐浓度对比结果，选择 40 mM 浓度，该浓度可提供最佳分离效果和峰形¹⁾。

峰形在 G 和 C 碱基数少于 2 个时表现良好 (图 6-A、B)。由于 G 和 C 比 A 和 T 更具极性，因此认为序列的极性会影响峰形。根据序列分子结构计算得出的辛醇 / 水分配系数 (logP) 与色谱峰的理论塔板数进行对比绘图。结果显示存在正相关性，即极性较低的序列能提供更好的峰形 (图 6-C)。

表6 图6的分析条件

系统	: Nexera UC
色谱柱	: Shim-pack UC-Diol II (100 mm × 2.0 mm I.D., 3 μm)
温度	: 35 °C
进样量	: 5 μL
流动相	: A) sc CO ₂ , B) 含 40 mmol/L 氨基乙醇 + 40 mmol/L 乙酸的甲醇 - 水混合液 (95:5, v/v), A/B=50:50
流速	: 1.5 mL/min
检测	: 260 nm (带高压池的 PDA 检测器)

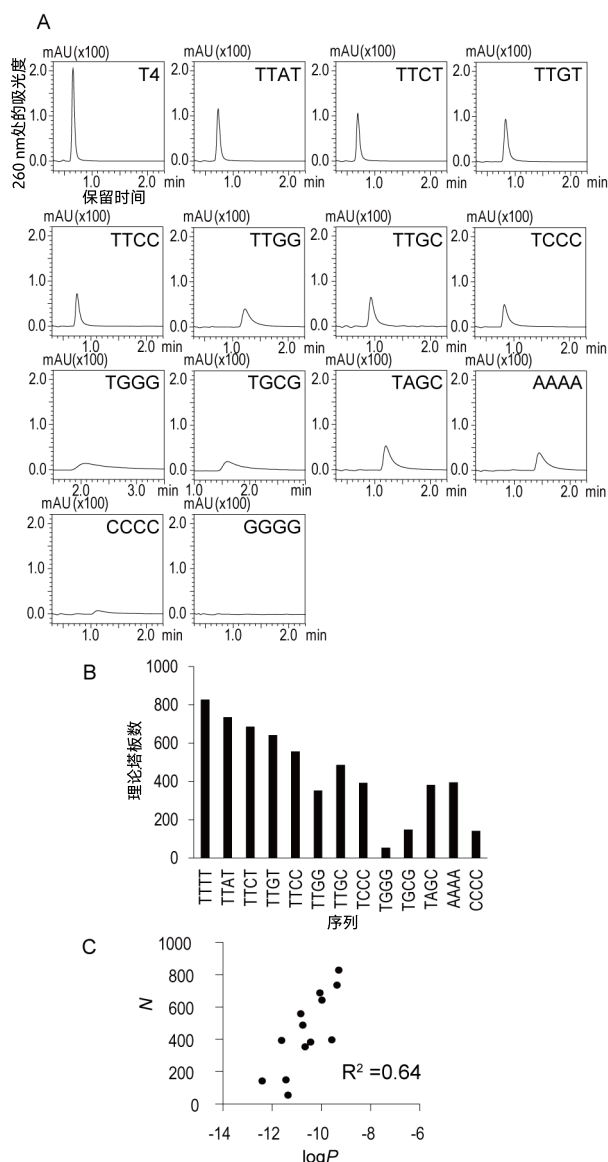


图6 (A) 紫外色谱图, (B) 理论塔板数 (N), (C) 14个序列的logP与N关系图

图4还显示, Diol II 色谱柱对 PS 修饰表现出特殊保留行为。我们绘制了 14 个序列的极性表面积^{*1}与保留时间的关系图(图 7-A), 发现两者呈高度正相关, 其相关系数高于 logP 与分子量关系图的相关系数。这可归因于二醇柱上的羟基与寡核苷酸极性基团之间的亲水相互作用。另一方面, 针对不同 PS 含量的 T4 分子, 保留时间与极性表面积的关系图(图 7-B) 则呈现负相关性。T4 的保留行为与碱基相反, 这一事实也表明 T4 在磷酸基团部分表现出特殊的保留行为。

*1 PSA 指极化分子表面积。

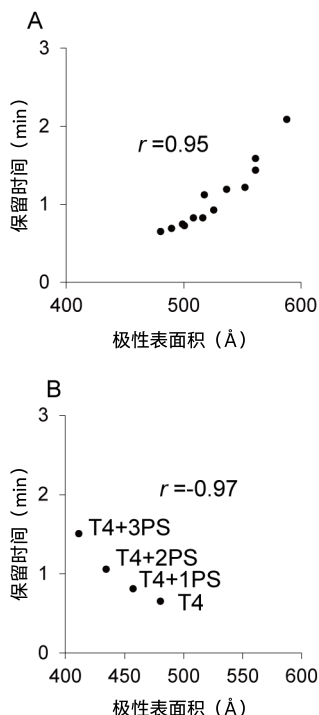


图7 (A) 14个序列和 (B) 不同PS含量的T4的保留时间与PSA的关系

4. 结论

为评估 SFC 在寡核苷酸分析中的适用性, 我们以不同 PS 含量的 4 聚体寡核苷酸为模型化合物开发了分离方法, 并研究了其基本保留特性。首先, 我们确定了使寡核苷酸洗脱的条件, 发现含有 50 mmol/L 甲酸铵的甲醇-水混合液可实现洗脱与峰检测。在上述条件下, 我们使用 12 种色谱柱对不同 PS 含量的 T4 进行了分析, 发现 Diol II 色谱柱具有良好的分离效果。为了将此方法应用于极性更强的序列, 我们重新评估了改性剂条件, 发现添加氨基乙醇可改善峰形。将优化方法应用于 14 个寡核苷酸序列表明, 含有两个或更少 G 或 C 碱基的序列适用于此方法。此外, 极性较高的序列表现出更强的保留性, 而不同 PS 含量的寡核苷酸随着极性增加保留性减弱, 这表明 PS 修饰具有独特的保留行为。对不同 PS 含量序列的高选择性表明, SFC 可用于分离 PS 修饰寡核苷酸合成过程中可能存在的、PS 键被 PO 键取代的杂质。

在后续研究中, 将评估 SFC 对长度超过 4 聚体的更长寡核苷酸的适用性。

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**, 464333
- 2) J. Molineau et al., *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **2021**, 193, 113736
- 3) Q. Gros et al., *J. Chromatogr. A*, **2021**, 1639, 461923

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: 2024 年 12 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

> 寡核苷酸治疗药物

> 价格咨询

> 产品咨询

> 技术服务/支持咨询

> 其他咨询