



合成寡核苷酸的快速与高分离度反相色谱分离

用于 LC/UV 和 LC/MS，且在高 pH 条件下可保持性能稳定的表面多孔填料色谱柱

应用简报

生物制剂与生物仿制药

作者

Phu Duong,
Brian A. Bidlingmeyer,
Alex Zhu 和 Stephen Luke
安捷伦科技有限公司

前言

基于 DNA 和 RNA 的合成寡核苷酸是一种成功的生物治疗药物，可以治疗多种疾病。其合成过程有多个步骤。尽管偶联效率很高，但随着循环次数的增加，寡核苷酸的总体收率会降低，主要杂质为单 (N-1) 和双 (N-2) 缺失的偶联失败。为确保药物效价，减少药物相互作用的可能性，需要得到高纯度的产品，因此，分析产品纯度尤为重要。寡核苷酸的分析方法有很多，其中最常见的是阴离子交换色谱法。这种方法分离度高，但通常需要很长时间进行分离。此外，鉴于其溶剂体系使用高浓度盐溶液洗脱寡核苷酸，无法兼容质谱。所以通过阴离子交换色谱法分析鉴定寡核苷酸及其杂质非常繁琐。

本应用简报中，我们展示了使用 Agilent AdvanceBio 寡核苷酸色谱柱对多种去保护（去除二甲氧基三苯甲基 (DMT)）DNA 和 RNA 寡核苷酸进行快速、高分离度的分离和鉴定。该色谱柱为填充表面多孔 Poroshell 填料的反相色谱柱，在高 pH 条件下依然性能稳定。这些填料有多孔外层和实心内核，限制了扩散距离，结合窄粒径分布，提高了分离速度，改善了色谱分析性能。色谱柱粒径为 2.7 μm ，额定压力为 600 bar，可在 HPLC 和 UHPLC 仪器上轻松使用。



Agilent Technologies

Poroshell 填料通过专有技术进行了化学改性，从而对 pH 高达 11.0 的流动相仍具有极高耐受性。封端的 C18 键合相和 100Å 孔径实现了良好的寡核苷酸选择性。本应用简报中的数据包括使用两种常见流动相梯度分离和鉴定 DNA 和 RNA 寡核苷酸。洗脱液易挥发，与 MS 兼容。一种含有醋酸三乙胺 (TEAA)，常用于 LC/UV 分离，另一种含有六氟异丙醇和三乙胺 (HFIP:TEA)，常用于寡核苷酸的 LC/MS 分析。LC/MS 数据也显示出良好的质量准确性，并提供了部分寡核苷酸的序列信息。将结果与全多孔杂化颗粒填料色谱柱的分离结果进行了比较。

材料与方法

色谱柱为 AdvanceBio 寡核苷酸色谱柱，2.1 × 50 mm (部件号 659750-702)。乙腈、甲醇、TEAA、HFIP 和 TEA 均购自 Sigma-Aldrich 公司。

DNA 样品为 DNA 寡核苷酸 (安捷伦寡核苷酸分子量标准品，部件号 5190-9029) (表 1)。色谱柱对比分析使用 23 mer RNA，MS 数据分析使用 25 mer DNA，均来自 NASD, Boulder。

RNA 样品为 RNA 寡核苷酸 (安捷伦寡核苷酸分离度标准品，部件号 5190-9028) (表 2)。

表 1. DNA 寡核苷酸特征

序列	序列	保证纯度	含量 (nmol)
15 mer	TTTTT TTTTT TTTTT	> 85%	2
20 mer	TTTTT TTTTT TTTTT TTTTT	> 85%	2
25 mer	TTTTT TTTTT TTTTT TTTTT TTTTT	> 85%	2
30 mer	TTTTT TTTTT TTTTT TTTTT TTTTT TTTTT	> 85%	2
35 mer	TTTTT TTTTT TTTTT TTTTT TTTTT TTTTT TTTTT	> 85%	2
40 mer	TTTTT TTTTT TTTTT TTTTT TTTTT TTTTT TTTTT	> 85%	2

表 2. RNA 寡核苷酸特征

序列	序列	保证纯度	含量 (nmol)
14 mer	rCrArCrUrGrArArUrArCrCrArArU	> 85%	2
17 mer	rUrCrArCrArCrUrGrArArUrArCrCrArArU	> 85%	2
20 mer	rUrCrArUrCrArCrArCrUrGrArArUrArCrCrArArU	> 85%	2
21 mer	rGrUrCrArUrCrArCrArCrUrGrArArUrArCrCrArArU	> 85%	2

LC/UV 条件

流动相:	A) 100 mmol/L TEAA 的水溶液 B) 100 mmol/L TEAA 的乙腈溶液
流速:	0.6 mL/min (或其他流速)
梯度:	见色谱图
停止时间:	见色谱图
后运行:	5 min
柱温:	65 °C
样品:	见色谱图
进样:	见色谱图
检测:	UV 260 nm

适用于 LC/MS 的条件

流动相:	A) HFIP:TEA (400 mmol/L:15 mmol/L) 的水溶液 B) 甲醇:流动相 A (50:50)
流速:	0.4 mL/min
梯度:	在 0.5 min 内 B 由 30% 升至 40%，然后在 5 min 内由 40% 升至 70%
样品:	25 mer DNA
温度:	65 °C
检测:	MS, 或 260 nm UV
最小范围:	400 m/z
最大范围:	1700 m/z
扫描速率:	3.00 幅谱图/秒
离子极性:	-ve
毛细管电压:	3500
喷嘴电压:	1000 V
碎裂电压:	200

仪器

- Agilent 1290 Infinity 液相色谱
- Agilent 6530 精确质量 Q-TOF LC/MS

结果与讨论

分离 N 和 N-1 寡核苷酸

分离 RNA 寡核苷酸

包含 4 种 RNA 寡核苷酸的寡核苷酸分离度标准品（范围为 14 至 21 mer），设计用于验证仪器和色谱柱分析合成寡核苷酸的性能（批间）。图 1 展示了 AdvanceBio 寡核苷酸色谱柱对该标准品的分离能力。所有的峰均在 9 分钟内分离，峰形尖锐、分离良好。N 和 N-1 RNA 寡核苷酸（21 和 20 mer）接近基线分离。数据表明，该色谱柱能够良好地将寡核苷酸主成分从其杂质中分离出来。

分离 DNA 寡核苷酸

通过分离含 6 种 DNA 寡核苷酸的寡核苷酸分子量标准品（范围 15 至 40 mer），证明了 AdvanceBio 寡核苷酸色谱柱对复杂样品的分离能力。图 2 表明所有 6 种寡核苷酸在 8 分钟内完成分离。所有峰均为基线分离度分离。15 mer DNA 寡核苷酸仅在短短 2 分钟内便开始洗脱，20 和 25 mer 寡核苷酸分别在 4 分钟和 5 分钟时洗脱。这些数据表明 AdvanceBio 寡核苷酸色谱柱适用于寡核苷酸的高通量分离。

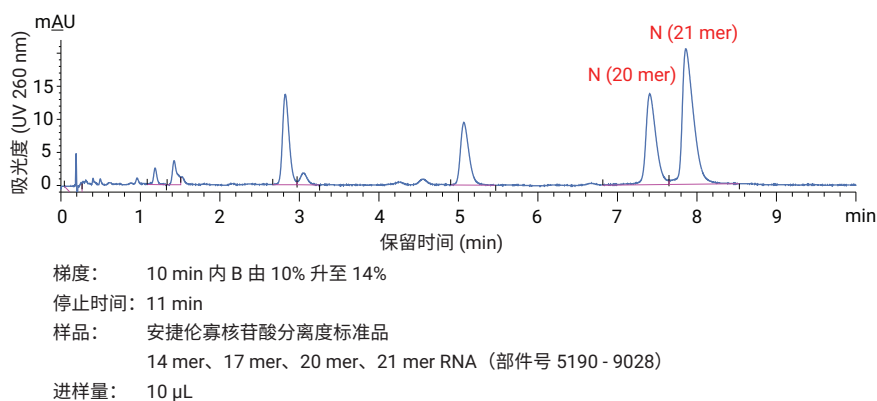


图 1. 使用 Agilent AdvanceBio 寡核苷酸色谱柱分离安捷伦寡核苷酸分离度标准品

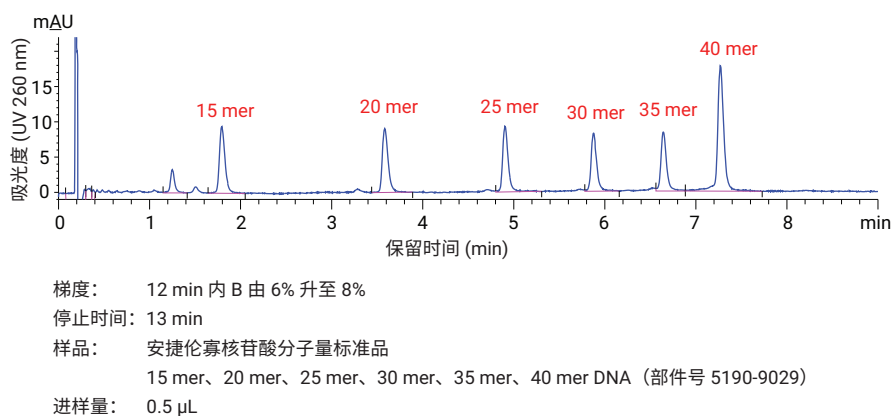


图 2. 使用 Agilent AdvanceBio 寡核苷酸色谱柱分离安捷伦寡核苷酸分子量标准品

质谱兼容性

为鉴定新生产和复制生产批次的寡核苷酸，确认其纯度，需要进行质谱分析。图 3 显示了 25 mer 单个 DNA 寡核苷酸的质谱结果。AdvanceBio 寡核苷酸色谱柱在仅约 3 分钟内对 25 mer DNA 寡核苷酸峰及其杂质实现了高色谱分离度。研究记录和报告了 UV 和 TIC 迹线，以及基线的放大图。主峰和 N-峰基线分离的放大图表明两条迹线非常相似，几乎平行。两种检测方法间的兼容性表明，MS 数据完全建立后，UV 迹线的灵敏度足以进行梯度运行，确定主峰和杂质（N-峰），无需再次使用 MS。图 4 显示了 TIC 迹线的解卷积数据以及完整标记的峰，表 3 显示了分析 25 mer DNA 寡核苷酸主峰及其杂质的精确质量数和各结构的百分比。表中的总和值表示色谱柱实现了 100% 的回收率。

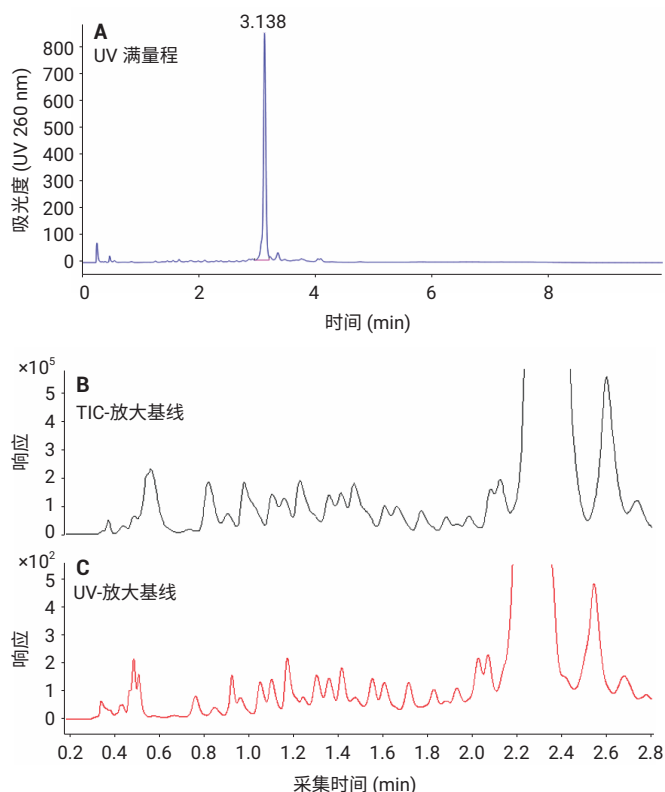


图 3. 使用兼容 MS 的溶剂分离 25 mer DNA 寡核苷酸

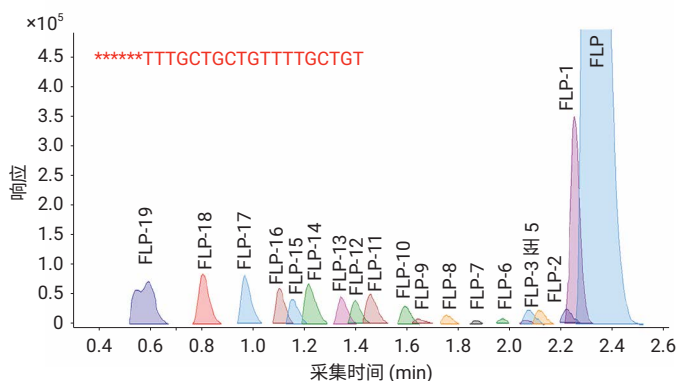


图 4. 由 Agilent AdvanceBio 寡核苷酸色谱柱分离的 25-mer DNA 寡核苷酸的 TIC 解卷积数据

表 3. 质谱分析和回收率

峰	响应	%
FLP	5089897	44.33
FLP-1	1656225	14.42
FLP-2	304129	2.65
FLP-3	303848	2.65
FLP-4	218243	1.90
FLP-5	113062	0.98
FLP-6	104555	0.91
FLP-7	110327	0.96
FLP-8	134341	1.17
FLP-9	134080	1.17
FLP-10	186947	1.63
FLP-11	358833	3.12
FLP-12	251690	2.19
FLP-13	272844	2.38
FLP-14	416306	3.63
FLP-15	238205	2.07
FLP-16	304333	2.65
FLP-17	403038	3.51
FLP-18	459344	4.00
FLP-19	422518	3.68
总和	11482765	100

色谱柱对比

表面多孔填料的结构为实心核加纤薄多孔表面，物质扩散进出多孔结构的距离更短，因此传质更快。图 5 比较了含 2.7 μm 填料的 AdvanceBio 寡核苷酸色谱柱和含 1.7 μm 全多孔杂化填料的 2.1 \times 50 mm 全杂化多孔色谱柱对 23 mer RNA 寡核苷酸的分离效果。数据表明，AdvanceBio 寡核苷酸色谱柱分析所得 23 mer RNA 寡核苷酸峰宽比 1.7 μm 全多孔杂化填料 C18 色谱柱所得峰宽更窄。这表明在表面多孔固定相的扩散进出距离更短使得物质传输更快，产生的峰分离度更高。与 1.7 μm 的全多孔杂化填料 C18 色谱柱相比，2.7 μm 粒径的 AdvanceBio 寡核苷酸色谱柱可以在更低的反压条件下运行，0.4 mL/min 时后者为 108 bar，前者为 292 bar。因此，AdvanceBio 寡核苷酸色谱柱可兼容 600 bar HPLC 系统以及 1200 bar UHPLC 系统，可实现快速分离。

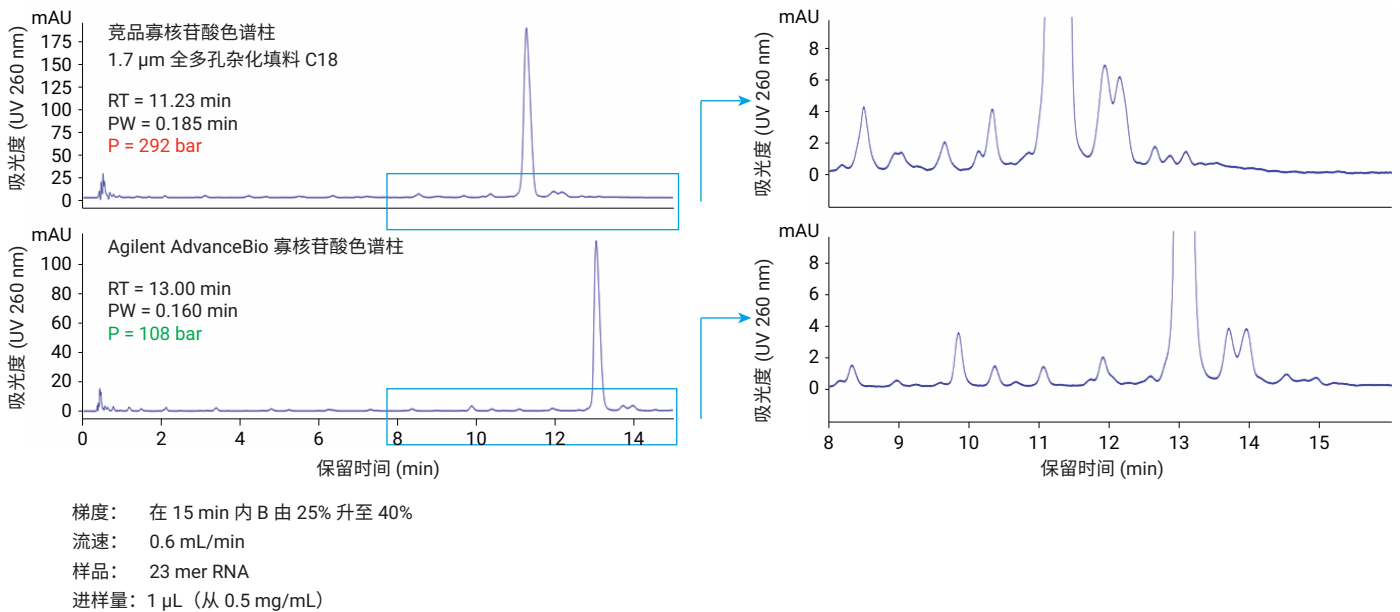
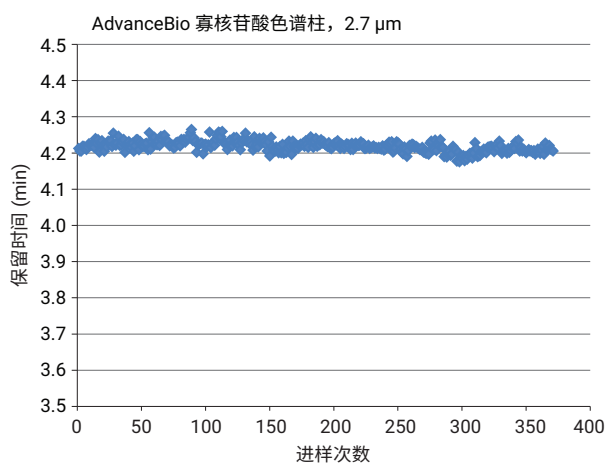
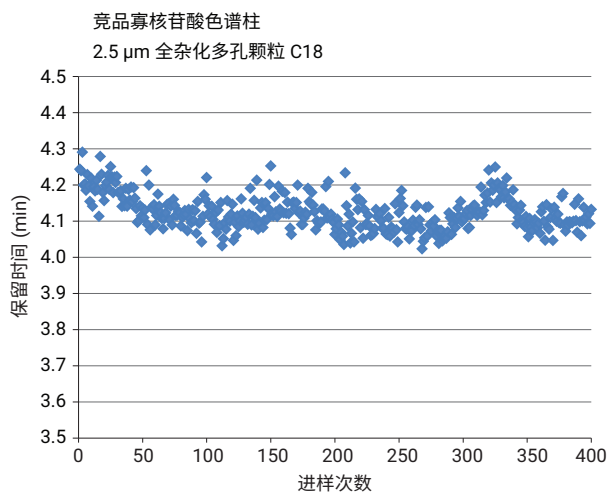


图 5. 比较使用 AdvanceBio 寡核苷酸 2.7 μm 色谱柱和 1.7 μm 全多孔杂化填料 C18 色谱柱（采用 HFIP:TEA 流动相）分离 25 mer DNA 寡核苷酸的结果

色谱柱稳定性

图 6 显示了 AdvanceBio 寡核苷酸色谱柱和 2.5 μm 全多孔杂化填料 C18 色谱柱的稳定性和对比数据，两根色谱柱尺寸均为 2.1 \times 50 mm。数据为在 65 $^{\circ}\text{C}$ 下，对 25 mer DNA 寡核苷酸连续进样约 400 次的结果。

记录峰保留时间，结果显示 AdvanceBio 寡核苷酸色谱柱的峰保留时间稳定、几乎不变、重现性佳，略优于竞品寡核苷酸色谱柱，即 2.5 μm 全多孔杂化填料 C18 色谱柱。这些稳定性数据表明，AdvanceBio 寡核苷酸色谱柱的寿命较长，与 2.5 μm 全多孔杂化色谱柱相当。



流速: 0.69 mL/min
梯度: 5 min 内 B 从 7% 升至 11%
运行时间: 8.5 min
样品: 25 mer RNA
进样量: 1 μL (0.5 mg/mL)

图 6. 色谱柱稳定性研究

结论

2.7 μm AdvanceBio 寡核苷酸色谱柱，具有在高 pH 条件下稳定的表面多孔填料，用于快速、高分离度分离不同大小的脱保护 RNA 和 DNA 寡核苷酸。色谱柱可使用含有高 pH（分析寡核苷酸的理想 pH）离子对试剂的 LC/UV 和 LC/MS 流动相，如 TEAA 和 HFIP:TEA (>pH 8.0)。AdvanceBio 寡核苷酸色谱柱的填料也被证明具有出色的样品分离度和色谱柱使用寿命。2.7 μm 的色谱柱粒径可兼容 600 bar HPLC 和 1200 bar UHPLC 系统。AdvanceBio 寡核苷酸色谱柱有多种尺寸选项，可以满足各种基于 DNA 和 RNA 的寡核苷酸分离和分析需求。

更多信息

这些数据仅代表典型的结果。有关我们的产品与服务的详细信息，请访问我们的网站 www.agilent.com。

查找当地的安捷伦客户中心：

www.agilent.com/chem/contactus-cn

免费专线：

800-820-3278, 400-820-3278 (手机用户)

联系我们：

LSCA-China_800@agilent.com

在线询价：

www.agilent.com/chem/erfq-cn

www.agilent.com

仅供科研使用。不用于临床诊断用途。

安捷伦对本资料可能存在的错误或由于提供、展示或使用本资料所造成的间接损失不承担任何责任。

本资料中的信息、说明和指标如有变更，恕不另行通知。

© 安捷伦科技（中国）有限公司，2015，2017

2017 年 11 月 2 日，

中国出版

5991-6006ZHCN



Agilent Technologies