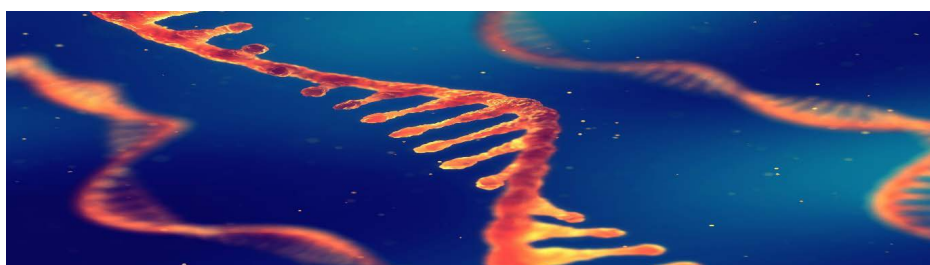


穿透容器直接鉴定市售寡核苷酸原料



作者

Frederic Pulliere 和
Christopher Welsby
安捷伦科技有限公司

摘要

手持式拉曼光谱仪可以直接穿透棕色瓶选择性地鉴定寡核苷酸原料（也称为亚磷酰胺）。本应用简报介绍了基于空间位移拉曼光谱 (SORS) 的安捷伦手持式拉曼光谱系统的原理和部署，用于在良好生产规范 (GMP) 环境中对亚磷酰胺进行化学身份验证。

前言

在 COVID-19 疫情期间，聚合酶链式反应 (PCR) 等常见的诊断方法被广泛用于快速检测是否存在 SARS-CoV-2。PCR 检测利用核苷酸或短链 RNA/DNA 分子，这些分子使用称为亚磷酰胺的受保护核苷作为结构单元合成得到。这些结构单元的不同排列、化学修饰和数量使它们对 RNA/DNA 靶标序列具有特异性结合亲和力，可用于疾病筛查、生物医学研究和刑事取证。过去几年，需要用到寡核苷酸的应用数量急剧增加，寡核苷酸供应链面临着巨大的产量和质量压力。现行 GMP (cGMP) 规定的测试（如原辅料进库时的鉴定测试）用于维持寡核苷酸的质量标准。它们是防止在寡核苷酸生产过程中引入错误原辅料、劣质原辅料或掺假原辅料的第一道防线。

在本应用简报中，使用 Agilent Vaya 拉曼原辅料身份验证系统（一种手持式拉曼光谱仪）分析了几种用于合成寡核苷酸的市售亚磷酰胺。如国际人用药品注册技术协调会 (ICH) 指南 Q11 所述，这些寡核苷酸可用作起始材料。该分析的目的是证明在 cGMP 生产环境中，拉曼光谱能够穿透透明和不透明容器有效鉴定/区分生物药物的原辅料。

拉曼光谱是一种符合大多数药典的鉴定测试要求的光谱技术

拉曼光谱作为一种光学技术，主要通过记录和分析特定分析物对入射单色光的非弹性散射来实现检测。大多数药典中都有详细介绍。特别是美国药典 USP <858> 章节拉曼光谱和 USP <1858> 拉曼光谱 — 理论与实践，欧洲药典 EP 2.2.48 章节，中国药典通则第 0421 节和日本药典（增补 II，JP XVII）第 2.26 节。这些药典介绍了拉曼光谱的相关理论、主要技术、仪器性能要求和相关应用，以支持医药机构的质量控制工作。在这些药典章节中，拉曼光谱作为分子光谱（如中红外光谱）的一种等效技术，可用于原辅料鉴定测试及其随后的生产放行^[1-4]。还提供了关于定性方法开发和验证的建议，以确保方法的可靠性^[5]。

SORS 是一种符合药典要求的拉曼光谱技术，可用于鉴定测试

使用手持式背散射拉曼光谱（也称为传统拉曼光谱 (CRS)）进行鉴定测试在许多药厂仓库中非常常见。它可以穿透透明容器（如聚乙烯塑料袋或玻璃瓶）快速鉴定原辅料。然而，CRS 只能穿透透明包装进行检测，这种局限性促使了 SORS 的出现，SORS 是一种经药典认证的可穿透不透明容器直接分析原辅料的方法。这类不透明容器包括多层纸袋、白色聚乙烯桶和蓝色桶。为了穿透容器鉴定原辅料，SORS 通常会在容器表面进行两次拉曼测量。一次称为“校零”，此时激发区域与检测区域一致。另一次测量则会“偏移”位置（即激发区域不再与检测区域重合），通常相隔几毫米。从采集的富含内容物信息的“位移”光谱中按比例扣除所采集的富含容器信息的“零位”光谱。然后即可获得不含容器信息的内容物光谱，并将其与已知的谱库谱图进行比较。例如，对于多层纸袋中的一水合乳糖，无需知晓纸袋材料或其相对信号贡献即可进行内容物鉴定检测。

专用于原辅料鉴定的快速 SORS

安捷伦推出了公司第一款用于 cGMP 环境的手持式 SORS 光谱仪 — Agilent Vaya。在药物原辅料进库时，可以使用 Vaya 合理安排检测并加速对原辅料的鉴定测试。Vaya 基于 SORS 技术，使仓库人员能够穿透透明和不透明容器直接对里面的赋形剂、活性药物成分和其他起始材料进行化学鉴定（图 1）。无需打开容器、无需取样、无需搬动容器，也不需要取样间。Vaya 利用 SORS 技术检测分析物的不同振动模式，从而获得独特的化学指纹图谱并确认分析物。它还可以区分分析物与类似物（如非对映异构体、位置异构体或多晶型结构），可靠性高且不存在假阳性。仓库工作人员和质量控制小组可以使用 Vaya 对来料进行快速验证，数小时内即可放行投入生产。相比之下，使用中红外、近红外或 CRS，这一过程可能需要几天时间。

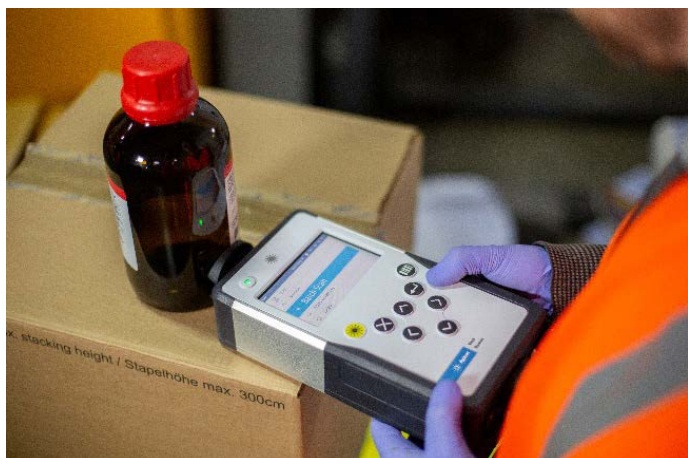


图 1. Agilent Vaya 拉曼光谱系统可以穿透棕色瓶直接验证寡核苷酸原料

轻松部署 Vaya

随着切合需求的手持式解决方案的普及，现在已经从传统的分子光谱技术（包括中红外和近红外）转向部署其他替代性鉴定解决方案，如 Vaya。向新的鉴定技术的过渡遵循一条简单的监管路径。在大多数地区，可以通过年度报告（美国）或 30 天内回复的电子申请（欧洲）提交生产变更申请，以增加替代方法。申请时提交的证明材料十分典型，即测试结果、与旧鉴定技术的可比性方案（可选）和/或比较验证数据。为了支持申请要求、获取证明材料以及后续部署，Vaya 具有支持美国联邦法规 (CFR) 第 21 章第 11 款 (21 CFR Part 11) 和 GMP 要求的功能。Vaya 基于向导的鉴定方法开发和验证模块使高级用户能够开发符合 USP <1225> 或 ICH Q2 (R1) 要求的可靠方法。

在验证模块中，可以将开发中的方法与生产中的其他现有方法进行交叉检查，以验证是否存在鉴定冲突（图 2）。

此外，可以利用阳性和阴性挑战样品来测试方法的稳定性和有效性（图 3）。Vaya 会邀请用户测试不同批次：容器中装有正确原辅料时在不同位置处取样，用于阳性挑战测试；以及可能进入仓库的结构高度相似的化学品，用于阴性挑战测试。在 cGMP 合规性和审计方面，验证模块包括自动报告和审计追踪追溯功能。

A Method Assessment 21 Sep 21, 11:14 FPr

DMT DABZ PHOSPHORAMIDITE V1

Method	Result	LMC Score	R ² Score
⚠ DMT 20 METHYL RABZ PHI Pass		0.914	0.910

B Method Assessment 21 Sep 21, 12:46 FPr

DMT DABZ PHOSPHORAMIDITE V2

Method	Result	LMC Score	R ² Score
No similar methods detected			

图 2. 方法评估：对照生产中使用的 DMT-dA(bz) 亚磷酸胺方法进行交叉检查，(A) 在添加类似样品之前，(B) 在添加类似样品（即 DMT-2'O-甲基-rA(bz) 亚磷酸胺）之后

A Validation Scan Results 21 Sep 21, 12:23 FPr

Spectra Result

✓ Validation Pass Status: Enabled

Method: DMT 20 METHYL RABZ PHOSPHORAMID...

Sample ID: 2021_09_21_1107_1 Expected Result: Pass

Date/Time: 21 Sep 21, 11:07 Actual Result: Pass

Add Comment
Disable
Finish

B Validation Scan Results 28 Oct 21, 08:41 FPr

Spectra Result

✓ Validation Pass Status: Enabled

Method: DMT 20 METHYL RABZ PHOSPHORAMID...

Sample ID: 2021_09_21_1224_3 Expected Result: Fail

Date/Time: 21 Sep 21, 12:24 Actual Result: Fail

Add Comment
Disable
Finish

图 3. DMT-2'O-甲基-rA(bz) 亚磷酸胺的 (A) 阳性挑战测试和 (B) 阴性挑战测试扫描结果

部署后，硬件/软件和方法的定期性能确认 (PQ) 足以证明其适用性。Vaya 包括一个系统检查模块（图 4），数秒内即可根据 USP <858> 和 EP 2.2.48 的光度和波长准确度、光度精密度以及激光功率要求完成仪器性能验证。

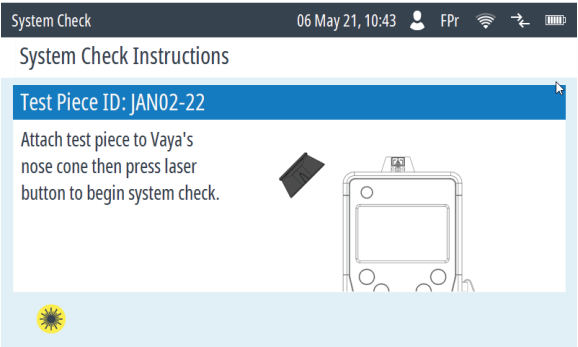


图 4. 使用系统检查模块，可以根据 USP 和 EP 要求轻松检查 Agilent Vaya 拉曼光谱系统的性能

使用现有的保留材料或标准品运行简单的鉴定测试，可以很容易地重新验证这些方法。SORS 拉曼光谱/信号仅取决于分析物的化学组成，而不像 NIR 那样会受到分析物物理特性的影响，因此无需进行方法维护。

在仓库中，几乎无需培训即可使用 Vaya 执行多项任务。身份验证测试（也称为“批处理扫描”，图 5）使用严格的专用工作流程并可提供有意义的答案，使非技术用户也能够轻松地在仓库中执行分析。

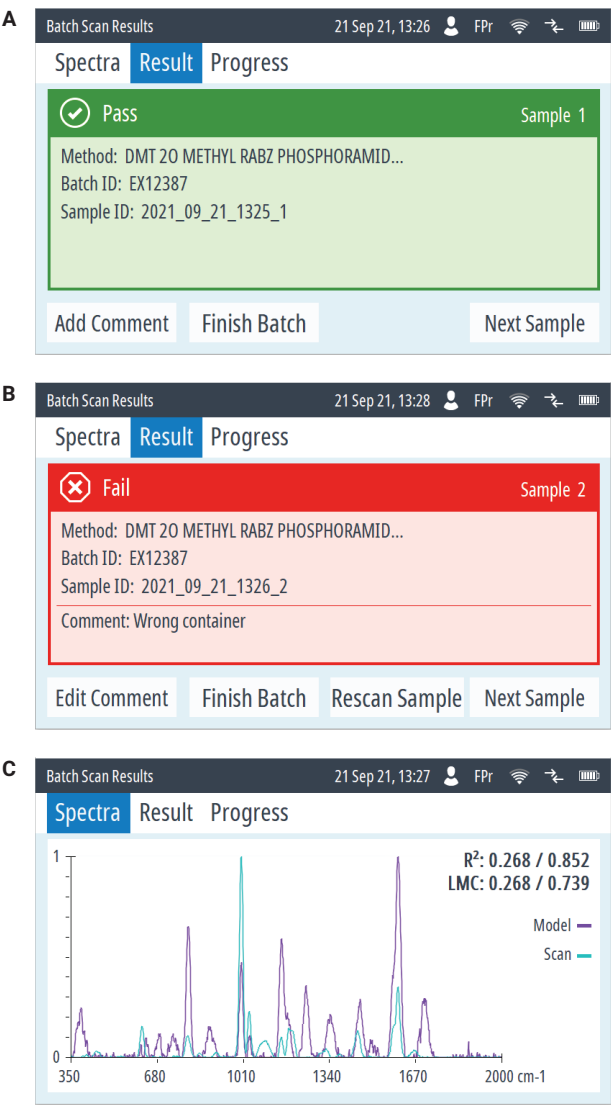


图 5. Agilent Vaya 拉曼光谱系统用不同的颜色来表示原辅料身份验证的通过 (A) 或失败 (B) 结果。还可以对照参考模型显示分析物的光谱，以供进一步确认 (C)

实验部分

所有低聚亚磷酰胺结构单元均由 Sigma Aldrich 提供。为每种寡核苷酸结构单元材料创建身份验证方法。开发这些方法是为了能穿透制造商提供的棕色瓶直接进行身份验证。测试的几种寡核苷酸具有非常相似的光谱，能够证明该技术具有优异的选择性。每种方法都是基于对容器中的材料进行 10 次扫描获得的平均值创建的，并将光谱非常相似的材料作为类似样品添加到每种方法中，以提高选择性。在开发的验证阶段，根据预期的通过扫描（容器中的目标材料）和预期的失败扫描（容器中的不同类似材料）对生成的模型进行测试。最后，为了确认每个模型的选择性，每种寡核苷酸针对每个模型进行三次测试。

寡核苷酸样品为：

- DMT-2'O-甲基-rA(bz) 亚磷酰胺
- DMT-dA(bz)-CPG
- DMT-dG(ib) 亚磷酰胺
- DMT-dT 亚磷酰胺
- DMT-dA(bz) 亚磷酰胺

结果与讨论

图 6 显示了穿透棕色玻璃瓶获得的亚磷酰胺材料的光谱数据。DMT-dG(ib) 亚磷酰胺和 DMT-dA(bz)-CPG 的光谱在 1000 cm^{-1} 和 1500 cm^{-1} 区域表现出较大的光谱差异，很容易与其他四种寡核苷酸材料区分开来。然而，叠加谱图也表明三种寡核苷酸（DMT-2'O-甲基-rA(bz) 亚磷酰胺、DMT-dT 亚磷酰胺和 DMT-dA(bz) 亚磷酰胺）具有非常相似的光谱，这对于开发具有高选择性的可靠鉴定方法是一项挑战。在多个模型中，这些结构单元的得分很可能高于用于鉴定的双决策标准阈值，从而造成假阳性鉴定结果。

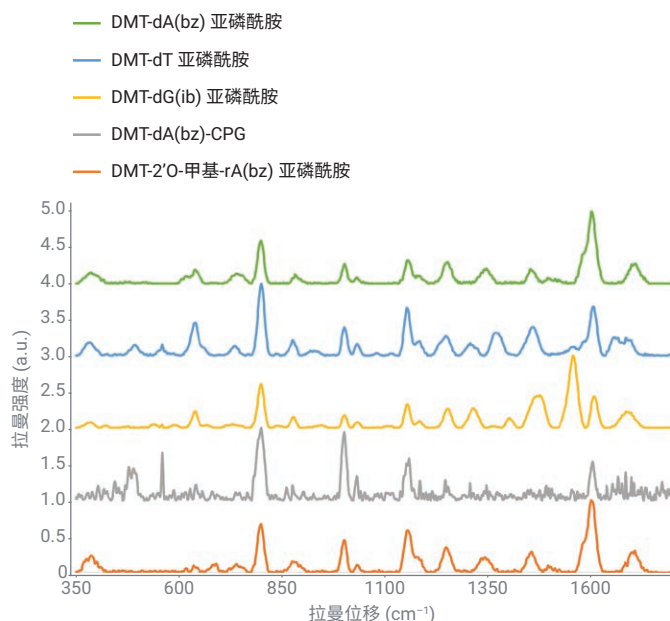


图 6. 穿透棕色玻璃采集的亚磷酰胺的拉曼光谱叠加图

图 7 中的挑战测试矩阵以图形方式展示了在未向方法中添加相似样品的情况下，Vaya 如何区分寡核苷酸的光谱。在挑战测试矩阵中，使用针对同一类别中每种分析物开发的鉴定测试方法对该类别中的每种分析物进行鉴定测试。对于一个理想的挑战测试矩阵，沿矩阵对角线只应有“通过率分数”（用绿色表示），表明该方法可以出色地鉴定相应的材料。在非对角线区域，理想矩阵应该只展示失败得分率（以红色方块表示），表明该方法可准确排除非目标分析材料。在此例中，矩阵不是完美的，三种最相似的材料之间存在明显的假阳性匹配。在这类情况下，如果样品组的化学性质和得到的光谱非常相似，以致于无法完全区分，Vaya 允许在方法创建中添加类似样品的光谱。通过添加这些额外的数据，仪器算法可以自动调整扫描得分阈值，以实现更准确的鉴定，避免出现假阳性结果。

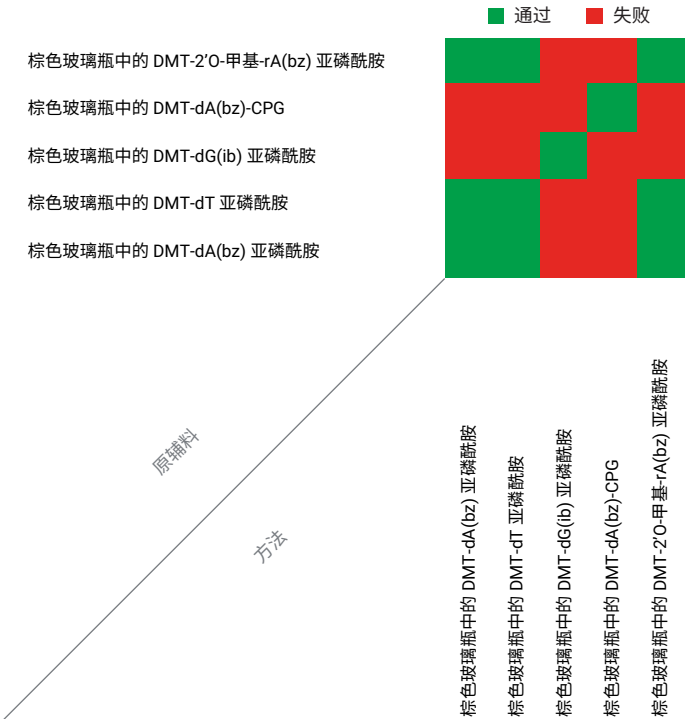


图 7. 未向模型中添加类似样品时的亚磷酸酯挑战测试矩阵

理想矩阵可以证明一组方法的假阳性水平极低，可以在仓库环境中实施。图 8 显示了寡核苷酸结构单元挑战测试矩阵，其中通过添加相应的类似物样品对方法进行了优化，增强了选择性。这表明 Vaya 可以穿透棕色玻璃轻松区分所有亚磷酸酯。

利用 Vaya 确定通过或失败结果

前一节中展示的 Vaya 的强大选择性，一部分原因是使用了基于相关系数 (R^2) 和线性模型系数 (LMC) 的双得分决策引擎。双得分系统具有诸多优势，因为 R^2 是拉曼光谱中常用的定量指标，可确保未知样品光谱与方法中的模型光谱足够相似。LMC 则提供额外的检查，以增强决策引擎的特异性。LMC 基于将挑战材料（即分析物光谱）等更多光谱纳入模型中，并观察其对 LMC 得分的影响。

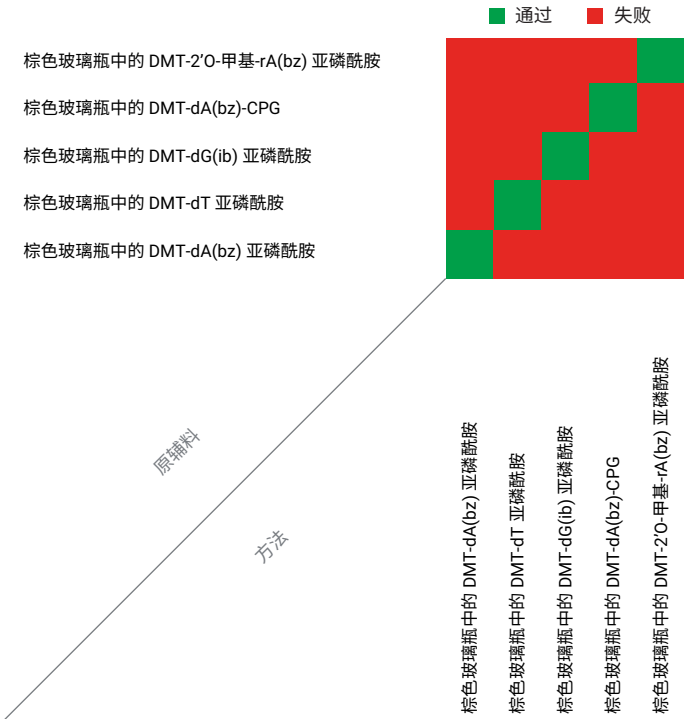


图 8. 向方法中添加类似样品后的亚磷酸酯挑战测试矩阵

结论

使用 Agilent Vaya 拉曼光谱系统，可以随时验证寡核苷酸原料 (如亚磷酰胺)，而无需打开容器。Vaya 可以快速评估原辅料，并快速检测装运错误，以及用高度相似的低成本类似物进行有意替换。使用 Vaya 可以在几秒钟内验证寡核苷酸和其他生物药物的原辅料。

参考文献

1. USP <1858> Raman Spectroscopy- Theory and Practice: Quote from Page 2/8 Section Qualitative and Quantitative Raman Measurements/ Qualitative Raman Measurements: Qualitative Raman measurements yield spectral information about the molecular structure of the sample. Because the Raman spectrum is specific for a given compound, qualitative Raman measurements can be used as a compendial identification test. See Spectroscopic Identification Tests <197>
2. European Pharmacopeia Chapter: EP 2.2.48 Raman Spectroscopy: When the Raman spectra of a sample and the Reference Standard of a substance to be identified are compared and both spectra exhibit similar scattering intensities at the same Raman shifts, the identity of those can be confirmed
3. 中国药典通则第 0421 节：拉曼光谱可以提供关于样品中振动谱带的准确光谱信息。在相同的测定条件下，绘制供试品与对照品的拉曼光谱并进行比对，若相同，除立体异构体外，即可鉴定为同一化合物
4. Japanese Pharmacopeia (Supplement II, JP XVII) section 2.26/ 5.1: When the Raman spectra of a sample and the Reference Standard of a substance to be identified are compared and both spectra exhibit similar scattering intensities at the same Raman shifts, the identity of those can be confirmed
5. European Pharmacopeia Chapter: EP 2.2.48: Record the spectra of a suitable number of materials which present typical variation (manufacturer, batch, particle size, impurity profile, etc.) and comply with the requirements of the monograph or established specifications. The number and selection of samples in the database depends on the specific application. Suitable mathematical pre-treatments of the Raman spectrum may facilitate qualitative comparison of spectra (e.g., baseline correction, normalization, derivatives, cosmic ray removal). The selectivity of the database that makes it possible to identify a given material and distinguish it adequately from other materials in the database is to be confirmed during the validation procedure. The spectra of the material to be examined can be compared with the spectral reference library using chemometric methods (e.g., similarity and distance measures, classification methods); these methods involve the set-up, assessment, and validation of chemometric model by the analyst

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/chem/raman-vaya

DE44483.199756944

本文中的信息、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，2021
2021 年 12 月 14 日，中国出版
5994-4239ZHCN