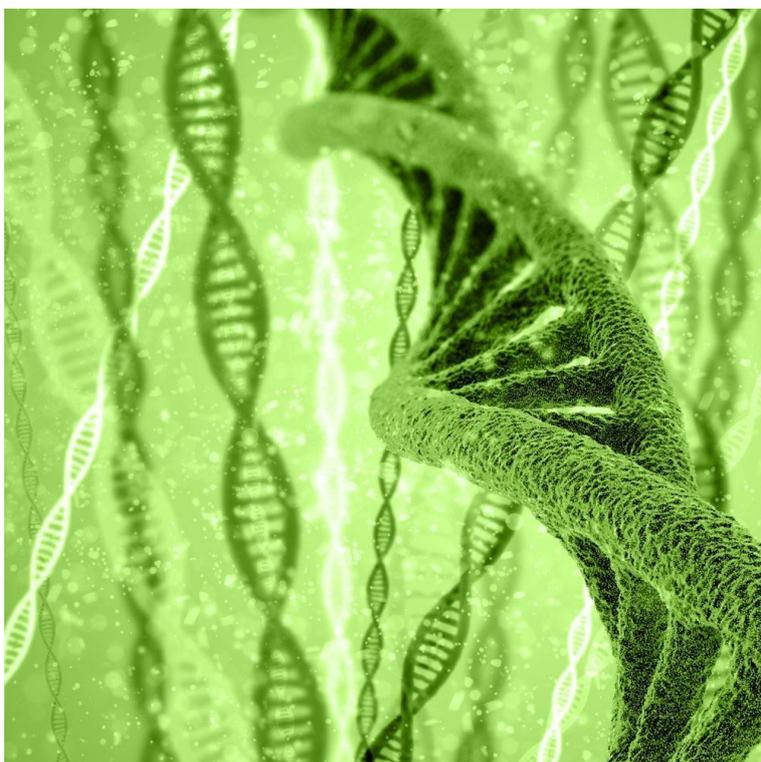


慧德易电子期刊

H&E Electronic Journal

第 143 期

东曹液相色谱技术在核酸药物分析中的应用



2021年8月

第 143 期 东曹液相色谱技术在核酸药物分析的应用

上次给大家介绍了东曹的液相色谱技术在核酸药物纯化中的应用，这次主要介绍一下核酸药物的分析。

核酸药物是生物医药发展的前沿领域，包括反义核酸（ASO）、小干扰 RNA（siRNA）、微小 RNA（miRNA）、小激活 RNA（saRNA）、信使 RNA（mRNA）适配体（aptamer）、核酶（ribozyme）、抗体核酸偶联药物（ARC）等，是基因治疗的一种形式，也是继小分子药物、蛋白药物、抗体药物之后的新一代制药技术。

治疗性寡核苷酸分离色谱模式如下图：

Chromatography Mode	Principle	Advantage	Disadvantage	Typical Chromatographic Conditions
Reversed-phase chromatography (RPC)	Hydrophobic interaction	<ul style="list-style-type: none"> High resolution Separation of structure isomers, chiral forms Various grade with different selectivity 	<ul style="list-style-type: none"> Broader peak separation due to many isoforms and chiral forms Sample loading is not relatively high 	<ul style="list-style-type: none"> Ammonium acetate, triethylammonium acetate as ion-pair (IP) reagents Gradient elution with organic solvent
Hydrophobic interaction chromatography (HIC)	Hydrophobic interaction	<ul style="list-style-type: none"> Much less use of organic solvent Separation of DMT-on and DMT-off form Partial separation of N-1 and P=O form Substitution to RPC 	<ul style="list-style-type: none"> Use of high concentration of salt and requires desalting after separation 	<ul style="list-style-type: none"> Reverse gradient by ammonium sulfate Elution with organic solvent for more hydrophobic sample
Ion-exchange chromatography (IEC)*	Electrostatic interaction	<ul style="list-style-type: none"> Higher sample loading Separation due to phosphate number; (N-1, N, N+1) 	<ul style="list-style-type: none"> Desalting or dilution is required prior to separation 	<ul style="list-style-type: none"> Gradient elution with salt at neutral to alkaline pH buffer Organic solvent may be added to elution buffer
Hydrophilic Interaction chromatography (HILIC)	Hydrophilic interaction	<ul style="list-style-type: none"> Separation of structure isomers, chiral forms Better sensitivity in MS detection without IP reagent 2-D HPLC analysis with RPC 	<ul style="list-style-type: none"> Lower resolution compared with RPC 	<ul style="list-style-type: none"> Reverse gradient elution of organic solvent like acetonitrile
Size-exclusion chromatography (SEC)**	Molecular size	<ul style="list-style-type: none"> Separation due to base number (MW) Separation with buffer close to physiological conditions 	<ul style="list-style-type: none"> Lower sample loading Lower resolution compared with RPC, IEC and HIC 	<ul style="list-style-type: none"> Isocratic elution at neutral pH buffer Organic solvent may be added to elution buffer

* By IEC, non-porous resin (NPR) can improve resolution like TSKgel DNA-NPR (2.5 mm) or TSKgel DNA-STAT(5 mm).

** By SEC, silica-based TSKgel SW column can separate oligonucleotide by molecular size due to number of nucleic base and phosphate group.

一、反相色谱（RPC）

影响RPC分离寡核苷酸及选择性的因素

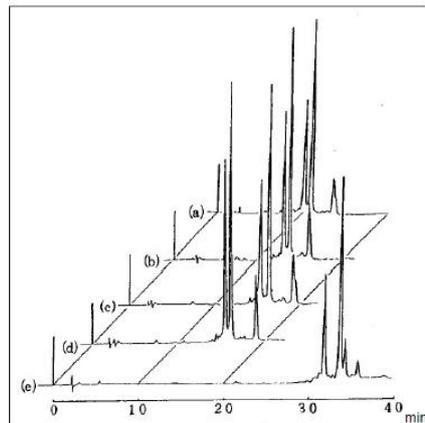
- 样品中核酸碱基
 - 疏水性；C < G < A < T
 - 异构体多，样品峰复杂
- 流动相中盐（离子对试剂）
 - 醋酸三乙铵 (TEAA) 或 醋酸己铵 (HAA) 增加保留提高分离度。
 - 三乙胺 (TEA) 配合 HFIP 在 LC/MS 分析中可增强质谱信号（例如：流动相添加 400 mmol/L HFIP, 15 mmol/L TEA, 甲醇）
 - 通常添加 50 - 100 mmol/L 离子对试剂可保证充分的保留和分辨率
- 温度
 - 温度高于 60 °C 保留减弱单链 DNA 更容易分离
 - 当温度低于 25 °C 时，分辨率随温度升高而降低
- 有机溶剂
 - 常使用乙腈作用为有机调节剂
 - 乙腈与甲醇有不同的分离选择性

寡核苷酸分离用TSKgel RPC 色谱柱

产品名称	粒径 (µm)	孔径 (nm)	官能团	碳含量 (%)	封端
TSKgel OligoDNA RP	5	25	C18, monomeric	12	否
TSKgel ODS-100V	3, 5	10	C18, monomeric	15	极性封端
TSKgel Super-ODS	2	14	C18, polymeric	8	是

- 单交联ODS色谱柱，流动相中有机溶剂含量低时分辨率也非常优异
- 没有封端的ODS色谱柱表现出核酸与硅醇基团之间的离子排斥作用，影响其分离与选择性

TSKgel OligoDNA-RP 分离寡聚核苷酸



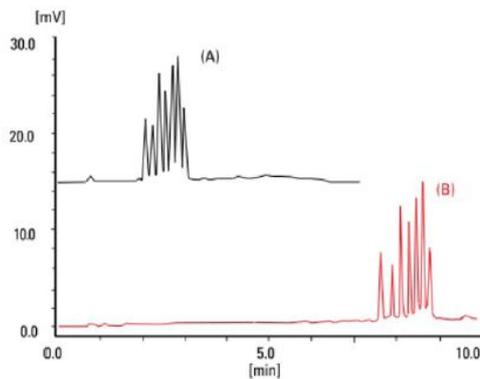
测定条件

色谱柱 : TSKgel Oligo-DNA RP (4.6 mm I.D. x 15 cm)
 流动相 : (A) 乙腈/缓冲液(pH7.0)=5/95
 (B) 乙腈/缓冲液(pH7.0)=25/75
 梯度 : 线性梯度 A→B (90 min)
 缓冲液 : (a) 25 mmol/L 醋酸铵缓冲液
 (b) 50 mmol/L 醋酸铵缓冲液
 (c) 100 mmol/L 醋酸铵缓冲液
 (d) 100 mmol/L 磷酸盐缓冲液
 (e) 100 mmol/L 醋酸三乙胺缓冲液
 流速 : 1.0 mL/min
 检测 : 260 nm
 进样量 : 20 µL
 样品 : oligodeoxyadenylic acid, p(dA)16, 20

- 与醋酸铵相比，醋酸三乙胺 (TEAA) 的保留更强
- 浓度在50~100 mM时，可获得足够的保留和分辨率

参见 Tosoh S/R No.051

TSKgel Super-ODS 分离寡聚核苷酸



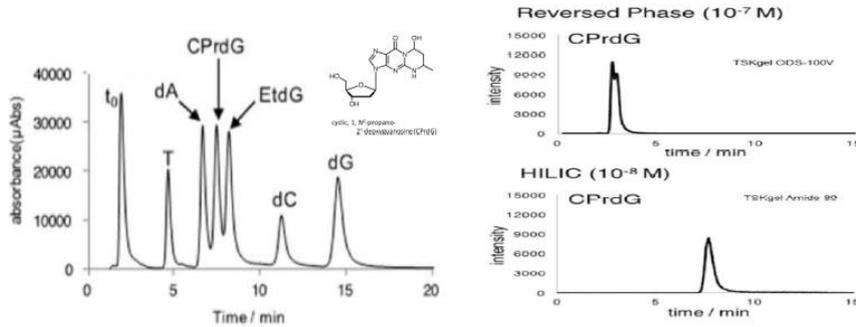
测定条件

色谱柱 : TSKgel Super-ODS (4.6 mm I.D. x 10 cm)
 流动相 : (A) 20mM P.B.+5mM TBAP (pH 6.0)
 (B) 乙腈
 梯度 : (A) linear, 32-49% ACN in 5 minutes
 (B) linear, 20-40% ACN in 10 minutes
 流速 : 1.5 mL/min
 检测 : 260 nm
 样品 : oligodeoxyadenylic acid, p(dA)12, 18

二、 亲水相互作用色谱（HILIC）

产品名称	粒径 (μm)	柱尺寸 (mm I.D. X cm)	官能团
TSKgel Amide-80	3	2.0 X 15	氨基甲酰

TSKgel Amide-80 分离DNA加合物（HILIC-MS）



Ref.: Progress in a selective method for the determination of the acetaldehyde derived DNA adducts by using HILIC-ESI-MS/MS. H.MURAKAMI et al., Talanta 2018, 177, 12-17

三、 离子交换色谱（IEC）

核酸分离用阴离子交换色谱柱（AIEC）

常使用非多孔树脂 (-NPR, -STAT 系列)分离分析

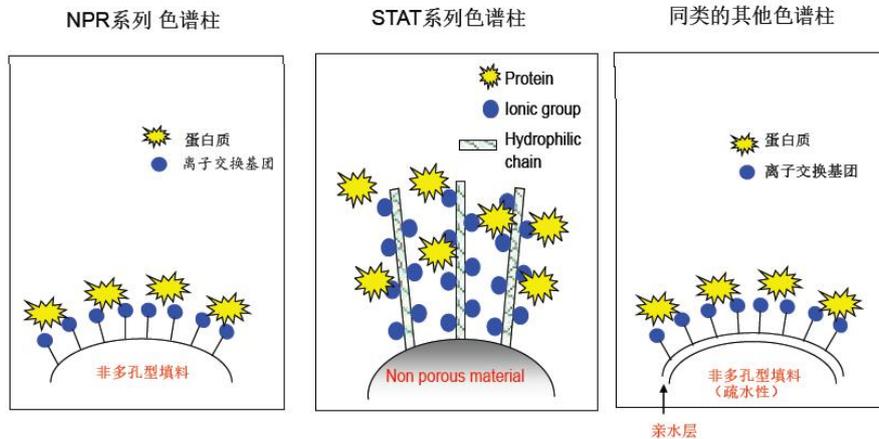
- 非多孔树脂 >>> 传质速度快、效率高、回收率高
- 多孔树脂 >>> 高效、大规模制备应用

产品名称	粒径 (μm)	柱尺寸 (mm I.D. X cm)	官能团
TSKgel DNA-NPR	2.5	4.6 X 7.5	DEAE-
TSKgel DNA-STAT	5	4.6 X 10	季胺
TSKgel SuperQ-5PW*	10	7.5 x 7.5	季胺

* 制备常用多孔类如TSKgel SuperQ 5PW(20)、Toyopearl GigaCap Q 650S等填料

离子交换介质的表面构造

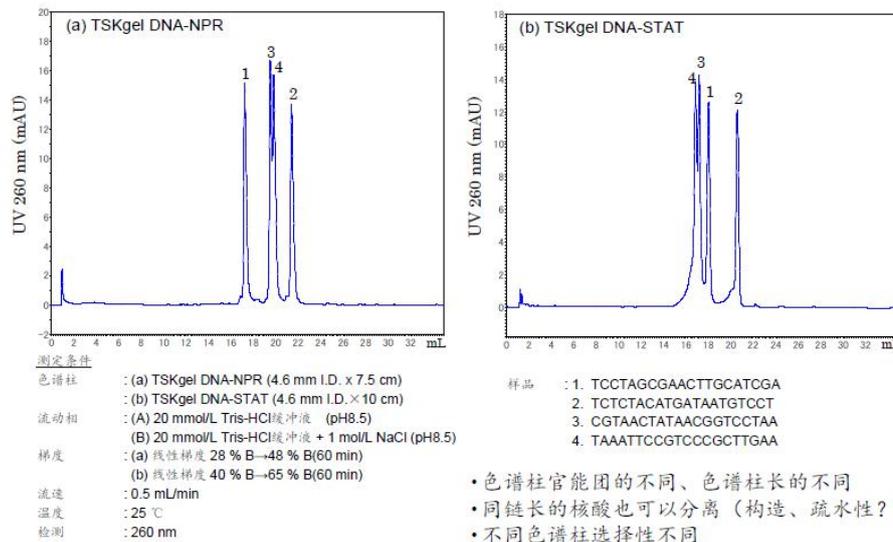
非多孔性填料: NPR, STAT系列色谱柱与同类型色谱柱的比较



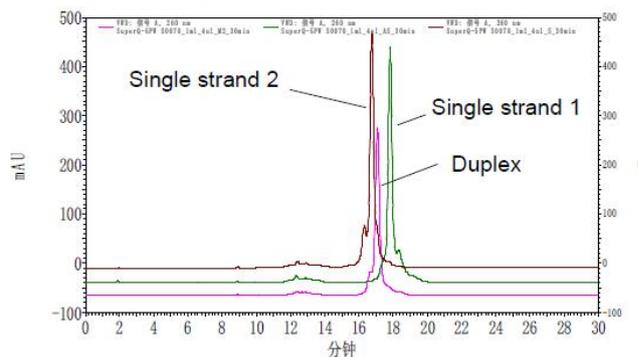
在AIEC分离中影响寡核苷酸分离的因素

- 盐的种类
 - 与NaCl相比, NaClO₄的离子强度更高、峰形更尖锐、可以更为弱化疏水相互作用
 - 对硫代型寡核苷酸吸附更强, 洗脱时需要更高的盐浓度(例: 2~3 M NaCl等)
- 洗脱液pH
 - pH越高吸附力(保留)越强、洗脱越迟缓
 - 常用10~20 mM NaOH溶液(pH 12)增加核苷碱基T、G及U的负电性。防止样品凝聚、改善峰型拖尾
- 有机溶剂
 - 样品疏水性高时, 可考虑在洗脱液中添加10~20%的乙腈
- 温度
 - 室温~60℃, 升高温度、保留增强

同链长(20mer) 4种寡聚核酸的AIEC分离



TSKgel SuperQ-5PW分离单、双链siRNA



Column: TSKgel SuperQ-5PW(7.5*7.5)
 Eluent: A: 20 mM PB, pH6.8
 B: 20 mM PB, 1M NaCl, pH 6.8
 Gradient: A→B, 30 min
 Flow rate: 1 ml/min
 Concentration: 1 mg/ml Injection volume: 4 μL
 Temperature: room temp.
 Detection: UV260 nm

→ Duplex was eluted between two single strands.

四、尺寸排阻色谱（SEC）

核酸分离用TSKgel SEC 色谱柱

选择适合样品分离的合适粒径与孔径大小非常重要！

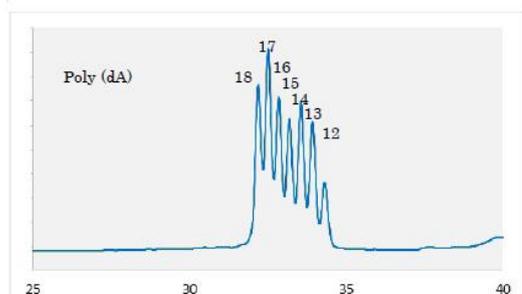
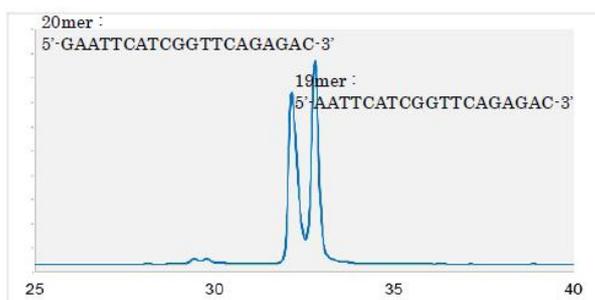
Product	Particle size(μm)	Pore size (nm)	Material	Column size (mm I.D. × cm)	Separation range (bp)
TSKgel G-DNA-PW	10	>100	polymer	7.8 × 30	1,000-7,000
TSKgel G6000PW _{XL} -CP*	10	>100	polymer	7.8 × 30	1,000-7,000
TSKgel G5000PW _{XL}	10	100	polymer	7.8 × 30	375-1500
TSKgel G4000SW _{XL}	8	45	silica	7.8 × 30	110-375
TSKgel G3000SW _{XL}	5	25	silica	7.8 × 30	55-110
TSKgel G2000SW _{XL}	5	12.5	silica	7.8 × 30	<55
TSKgel UP-SW Aggregate	3	25	silica	4.6 × 30	110-375
TSKgel UP-SW3000	2	25	silica	4.6 × 30	55-110
TSKgel UP-SW2000	2	12.5	silica	4.6 × 30	<55

【流动相】

硅胶基质（TSKgel SWXL, SW系列色谱柱）：磷酸盐缓冲体系（pH7.0）等
 聚合物基质（TSKgel PWXL, PW系列色谱柱）：Tris-HCl缓冲体系（pH7.5）等，*对阳离子脂质体使用 PWXL-CP

- 添加0.3 mol/L NaCl 或0.1 mol/L Na₂SO₄ 等可以抑制静电（离子）相互作用
- 有时也可考虑添加EDTA以抑制核酸酶的活性
- 添加浓度上限20%的水溶性有机溶剂，可抑制疏水相互作用

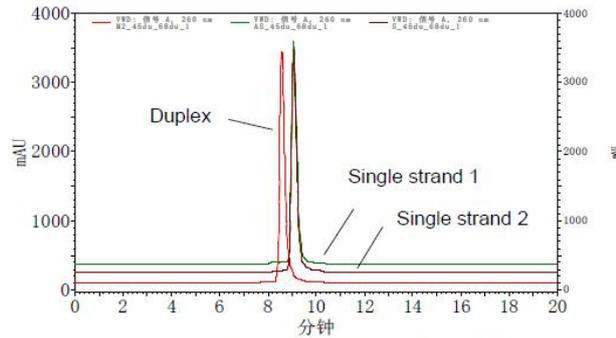
UP-SW2000色谱柱分析合成寡聚核苷酸（12-20 mer）



Conditions

Column: TSKgel UP-SW2000
 4.6 mm I.D. x 30cm x 2
 Mobile phase: 0.05% NaN₃ and 0.3 mol/L NaCl
 in 0.05 mol/L Phosphate (pH6.7)
 Flow rate: 0.2 mL/min
 Temperature: 25 deg. C
 Detection: 260 nm
 Sample: Oligonucleotide, 20mer, 19mer
 Poly(dA)

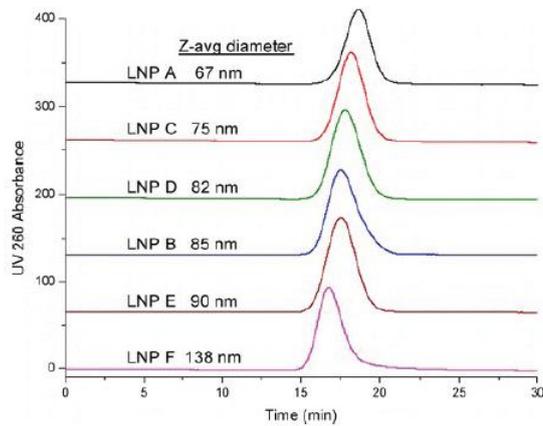
TSKgel SuperSW2000分离单、双链 siRNA



Column: TSKgel SuperSW2000(4.6*30)*1
 Eluent: 150 mM PB, 100 mM NaCl, pH6.8
 Flow rate: 0.35 ml/min
 Concentration: 1 mg/ml
 Injection volume: 4 μ L
 Temperature: 68 $^{\circ}$ C
 Detection: UV260 nm

→ siRNA Duplex and Single strands can be separated on SEC column under high temperature condition.

TSKgel G6000PWXL-CP分离脂质纳米颗粒(LNP)包被 siRNA



SEC of six LNPs on TSKgel G6000PWxl-CP eluted at 0.5 mL/min. UV 260 was used to monitor the elution of siRNA containing LNPs. Each LNP possesses a unique Z-avg hydrodynamic diameter as annotated in the figure. The sizes are from the DLS measurement of bulk samples

Ref.; Jingtao Zhang*, R. Matthew Haas and Anthony M. Leone, Anal. Chem.2012, 84, 14, 6088-6096

小结:

反相&亲水作用色谱

- 使用TSKgel OligoDNA RP或TSKgel ODS-100V色谱柱可以分离链长有差异或同链长（20mer）的寡聚核苷酸，Super-ODS用于快速分离。使用离子对试剂醋酸三乙胺（TEAA）可以增强对核酸的保留。
- 使用TSKgel Amide-80色谱柱可以增强HILIC-ESI-MS分析核酸样品质谱检测灵敏度。

阴离子交换色谱

- 使用TSKgel DNA-NPR或TSKgel DNA-STAT色谱柱可以分离链长有差异或同链长（20mer）的寡聚核苷酸，选择性有差异。碱性条件下稳定的核酸分离推荐使用NaOH流动相，碱性条件下不稳定的核酸分离推荐使用中性或弱碱性的流动相条件
- 提高柱温/测定温度可能会提高分辨率

分子尺寸排阻色谱

- 有效分离差异链长核酸（单链、双链）及不同尺寸脂质体包被的核酸短链核酸（<375 bp）推荐使用硅胶系列的TSKgel SEC色谱柱，长链核酸（<7,000 bp）推荐使用聚合物基质的TSKgel G-DNA-PW色谱柱，对阳离子脂质体包被核酸推荐使用PWXL-CP

* 如果需要更详细的资料，请联系我们。



北京慧德易科技有限责任公司

咨询电话：010-59812370/1/2/3

公司官网：www.prep-hplc.com

邮 箱：sales@prep-hplc.com

微信公众号：北京慧德易