

慧德易电子期刊

H&E Electronic Journal

第 162 期 核酸药物分析用 TSKgel 色谱柱的选型
及应用案例



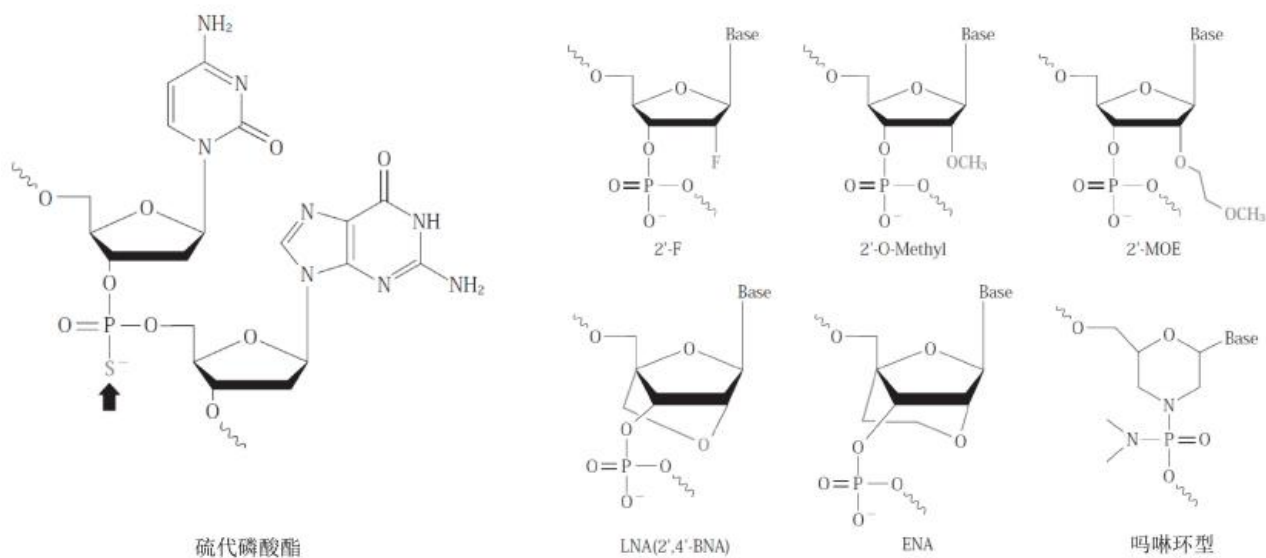
2023 年 5 月

第 162 期 核酸药物分析用 TSKgel 色谱柱的选型 及应用案例

寡核苷酸的 HPLC 分析方法

治疗性寡核苷酸是由固相化学合成工艺生产。在合成过程中会产生工艺相关杂质和产品相关杂质。产品相关杂质包含许多目标产物的类似物（分子量的差别：碱基数 N-1、N、N+1 等），磷酸基 S 化等的不对称化合物、异构体等。因此，杂质的分析监控对工艺和质量控制就显得十分重要。液相色谱技术具有样品适用范围广、分离效率高、速度快等特点，已成为核酸药物生产与质控分析必不可少的重要手段。

图 1 寡核苷酸的磷酸化及糖基修饰



磷酸化修饰：空间配置引起的异构体（但都是有效成分）

糖基修饰：通过架桥增强对核酸酶的耐受和降低毒性（如吗琳环型）

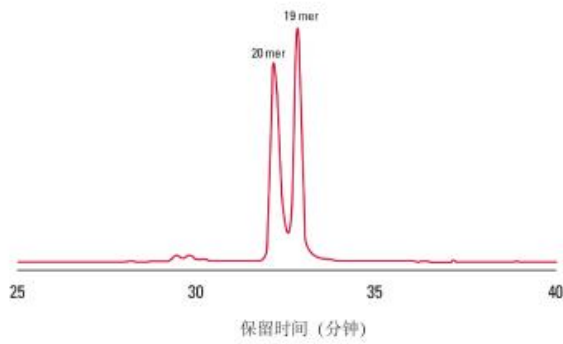
碱基修饰：适配体立体构造的多样性

表 1 寡核苷酸分离常用的 HPLC 分离模式及适用的 TSKgel 色谱

| 分离模式 | 分离原理 | 特长及用途 | 适用的色谱柱 |
|----------------|-----------------|---|---------------------|
| 尺寸排阻色谱 (SEC) | 分析物的分子尺寸大小 | 1. 可以使用接近生理条件的洗脱溶液进行分离 2. 基于碱基数不同分离 (Mw) 3. 用于质量控制或纯度含量分析 | TSKgel UP-SW 系列 |
| | | | TSKgel SWXL 系列 |
| | | | TSKgel PWXL 系列 |
| | | | TSKgel G-DNA-PW 系列 |
| 离子交换色谱 (IEC) | 分析物与固定相间的离子相互作用 | 样品载量高 | TSKgel DNA-NPR |
| | | 可以根据磷酸基的数量分离样品(N-1, N, N+1) | TSKgel DNA-STAT |
| 反相色谱 (RPC) | 分析物与填料间疏水性 相互作用 | 分辨率高 结构异构体、不对称体的分离 | TSKgel Oligo DNA-RP |
| | | | TSKgel ODS-100V |
| | | | TSKgel Super-ODS |
| 亲水作用色谱 (HILIC) | 分析物与填料间亲水性 相互作用 | 增强 HILIC-ESI-MS 质谱检测灵敏度 (不加离子对试剂条件下) 结构异构体、不对称体的分离 | TSKgel Amide-80 2μm |

应用实例

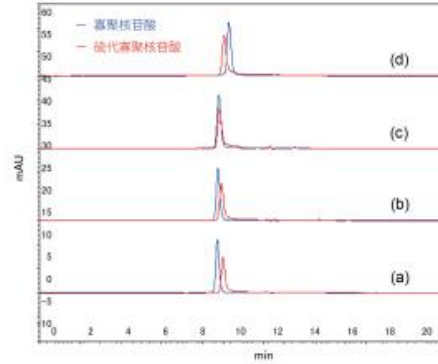
图 1. 超高效 SEC 色谱柱分离 N 及 N-1 寡核苷酸



色谱柱: TSKgel UP-SW2000 (2 μ m, 4.6 mm ID \times 30 cm \times 2)
 流动相: 50 mmol/L 磷酸盐缓冲液 (pH 6.7) + 300 mmol/L NaCl
 +0.03 % NaNa₃
 流速: 0.2 mL/min
 检测: UV @ 260 nm
 样品: 19-mer (5'-AATTCATCGGTTTCAGAGAC-3') & 20-mer
 (5'-GAATTCATCGGTTTCAGAGAC-3')

● 串联两根 30cm 柱长的 TSKgel UP-SW2000 色谱柱分析两种相差一个碱基的寡核苷酸混合物。

图 2. 流动相添加有机溶剂对硫代寡核苷酸 SEC 分析的影响

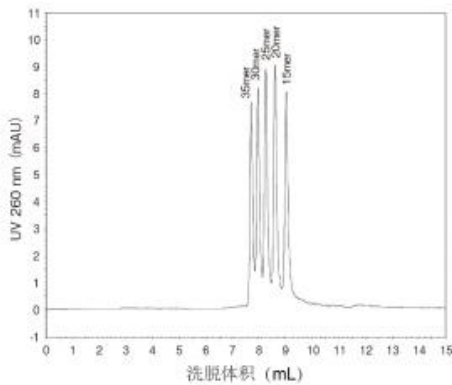


色谱柱: TSKgel G2000SWxl (7.8 mm I.D. \times 30 cm)
 流动相: 乙腈/20 mmol/L 磷酸盐缓冲液 +0.3 mol/L NaCl (pH7.0)
 =(a) 0/100, (b) 10/90, (c) 20/80, (d) 30/70

流速: 1.0 mL/min
 温度: 25 $^{\circ}$ C
 检测: 260 nm
 进样量: 10 μ L
 样品: 20 mer 的寡核苷酸及 S 代寡核苷酸, 1 pmol/L

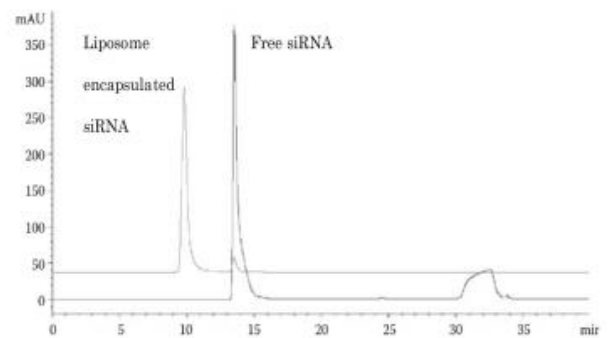
● 添加20%的乙腈会抑制硫代寡核苷酸与固定相间的疏水相互作用。

图 3. 合成寡核苷酸的 SEC 分析



色谱柱: TSKgel G2000SWxl (7.8 mm I.D. \times 30 cm)
 流动相: 0.1 mol/L 磷酸盐缓冲液+ 0.3 mol/L NaCl (pH 7.0)
 + 1 mmol/L EDTA
 流速: 0.125 mL/min
 检测: UV (260 nm)
 温度: 25 $^{\circ}$ C
 样品: 合成寡核苷酸 (15, 20, 25, 30, 35 mer)

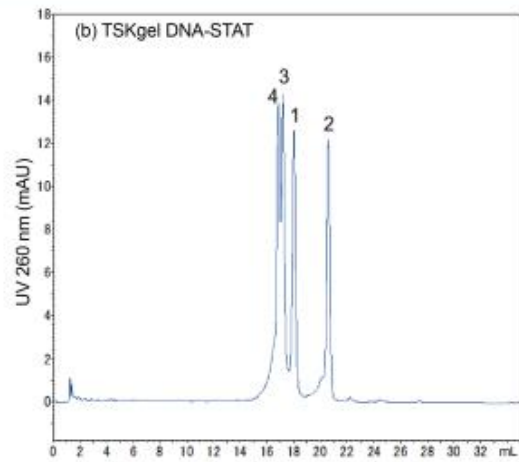
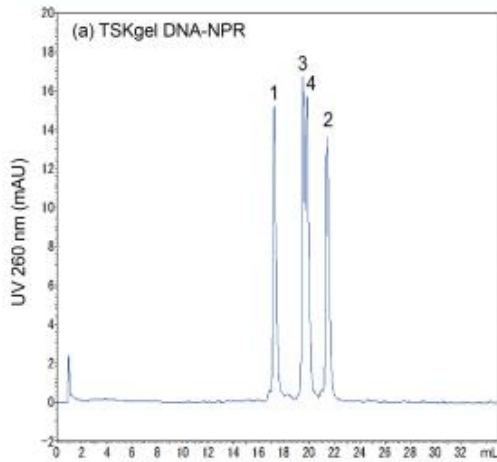
图 4. 脂质体包被的 siRNA 的 SEC 分离



色谱柱: TSKgel SuperSW2000 (4.6 mm I.D. \times 30 cm) \times 2
 流动相: PBS (pH 4.0)
 流速: 0.4 mL/min
 检测: UV
 温度: 25 $^{\circ}$ C

Ref.; Handbook of analysis of oligonucleotides and related Products, Feb. 23 (2011) 125, Edited by J. V. Bonilla et al.,

图 5. 同链长的 4 种寡聚核酸的 AIEC 分离

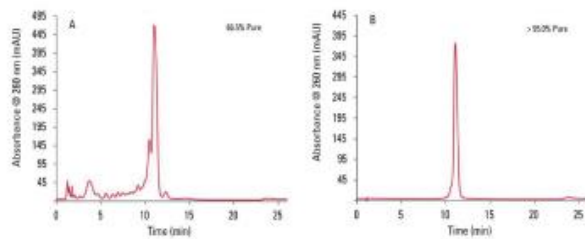


色谱柱: (a) TSKgel DNA-NPR (4.6mm I.D.×7.5 cm)
 (b) TSKgel DNA-STAT (4.6mm I.D.×10 cm)
 流动相: (A) 20 mmol/L Tris-HCl缓冲液 (pH8.5)
 (B) 20 mmol/L Tris-HCl缓冲液 + 1 mol/L NaCl (pH 8.5)
 梯度: (a) 线性梯度 28 % B→48 % B(60 min)
 (b) 线性梯度 40 % B→65 % B(60 min)
 流速: 0.5 mL/min
 温度: 25 °C
 检测: 260 nm

样品: 1. TCCTAGCGAACTTGCATCGA
 2. TCTCTACATGATAATGTCCT
 3. CGTAACTATAACGGTCCTAA
 4. TAAATTCGGTCCCGCTTGAA

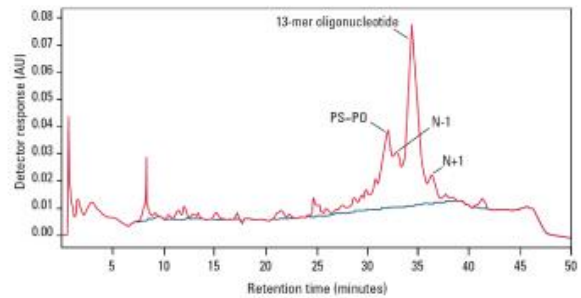
- 色谱柱官能团的不同、色谱柱长的不同,不同色谱柱的选择性也不同。
- 同链长的核酸也可以分离(根据构造和疏水性的差异)。

图 6. 精纯后硫代寡聚核苷酸各组分的 AIEC 分析



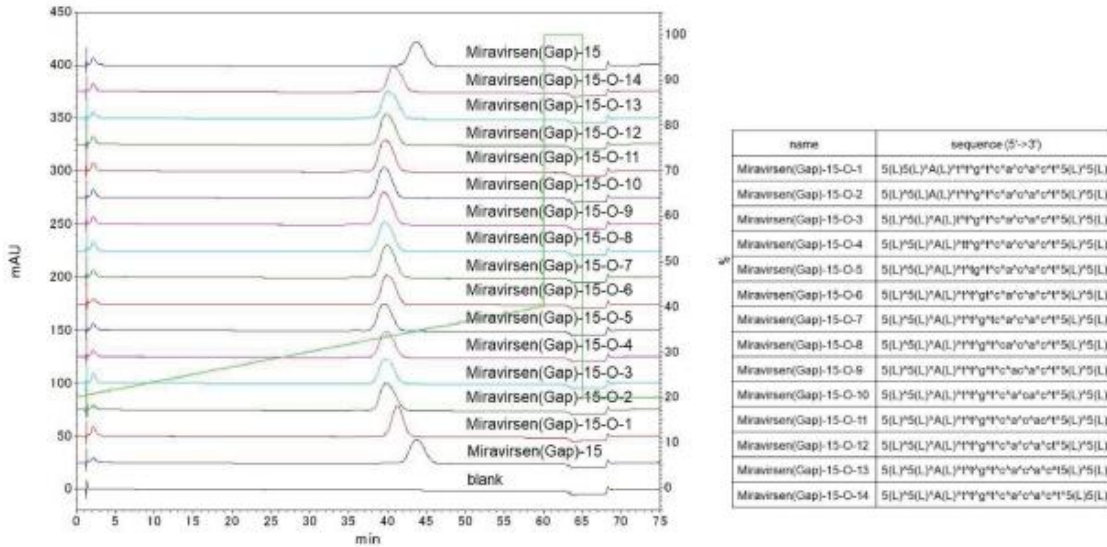
色谱柱: TSKgel DNA-STAT (4.6 mm I.D.×10 cm)
 流动相: (A) 100 mmol/L Tris+10% ACN (pH 8.0)
 (B) 100 mmol/L Tris+2.0 mol/L NaCl+10% ACN (pH 8.0)
 梯度: 30→100% B (20min)
 流速: 180 cm/hr (0.5 mL/min)
 温度: 60 °C
 检测: UV@260 nm
 进样量: 10 μL
 样品: A-粗寡核苷酸 24 mer 硫代磷酸寡核苷酸
 B-提纯后的寡核苷酸溶液 初提纯度:67%

图 7. 硫代寡聚核苷酸的 AIEC 分离



色谱柱: TSKgel DNA-NPR (4.6 mm I.D.×7.5 cm)
 流动相: A: 20 mmol/L NaOH (pH 12) + 10 mmol/L NaBr + 1% 二乙胺
 B: 20 mmol/L NaOH (pH 12) + 1 mol/L NaBr + 1% 二乙胺
 梯度: 3.5 min (20% B), 12 min (20% B), 45 min (55% B)
 流速: 1.0 mL/min
 检测: UV (260 nm)
 温度: 60°C (自动进样: 4C)
 样品: 粗合成寡核苷酸 (13 mer, 脱保护)

图 8. Miravirsen (LNA) 及衍生物的AIEC分离



色谱柱: TSKgel DNA-STAT (4.6 mmI.D.×10 cm)

流动相: (A) 乙腈/40 mM Tris-HCl 2 mM EDTA (pH8.5)/H₂O=30/50/20

(B) 乙腈/40 mM Tris-HCl 2 M NaClO₄ 2 mM EDTA(pH8.5)/H₂O=30/50/20

梯度: B %: 20 %(0 min)-40 %(60 min)-100 %(60.1 min)-100 %(65 min)-20 %(65.1 min)-20 % (75 min)

流速: 0.5 mL/min

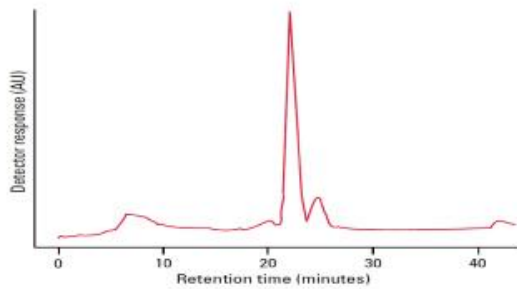
检测: UV(260 nm)

温度: 60 °C

进样量: 10 μL

样品: Miravirsen及衍生物, 20 μmol/L

图 9. 吗啉环寡聚核酸的 AIEC 分离



色谱柱: TSKgel SuperQ-5PW (10μm,7.5 mm ID x 7.5 cm)

流动相: A: 10 mmol/L NaOH

B: 含有10 mmol/L NaOH的1mol/L NaCl

梯度: 0 min (0%B) 40 min (50%B)

41 min(100%B) 46 min (100%B)

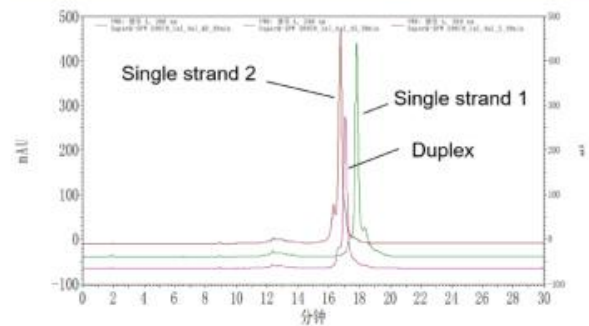
流速: 1mL/min

检测: UV(254 nm)

样品: 16 个碱基的吗啉寡核苷酸, AAG AAG AAG AGG GG A G

样品载量: 0.5 O.D(光密度)

图 10. 单、双链 siRNA 的 AIEC 分离



色谱柱: TSKgel SuperQ-5PW (7.5 mm I.D.×7.5 cm)

流动相: A: 20 mM PB, pH6.8

B: 20 mM PB, 1M NaCl, pH 6.8

梯度: A→B, 30 min

流速: 1 ml/min

浓度: 1 mg/ml

进样量: 4 μL

温度: 室温

检测: UV260 nm

质粒的 HPLC 分析方法

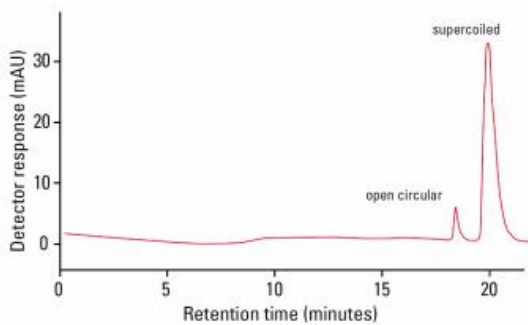
随着基因治疗和 DNA 疫苗的迅速发展，高纯度的质粒 DNA 的需求量越来越大。药物级质粒 DNA 必须要符合宿主相关杂质、均一性方面的要求。因此，在质粒纯度检测时，需要区分出超螺旋、开环和线型三种拓扑异构体质粒。

表 2 质粒分离常用的 HPLC 分离模式及适用的 TSKgel 色谱柱

| 分离模式 | 分离原理 | 特长及用途 | 适用的色谱柱 |
|--------------|--------------------------------|---------------|-------------------------------------|
| 尺寸排阻色谱 (SEC) | 分子尺寸大小 (质粒分子较大，在排阻 V0 附近洗脱) | 用于质量控制或纯度含量分析 | TSKgel G6000PWXL TSKgel G-DNA-PW |
| 离子交换色谱 (IEC) | 电荷的差异 (质粒带高负电荷) | 分离质粒拓扑异构体 | TSKgel DNA-NPR |
| 疏水色谱 (HIC) | 疏水性的差异 | 分离质粒拓扑异构体 | TSKgel Butyl-NPR |

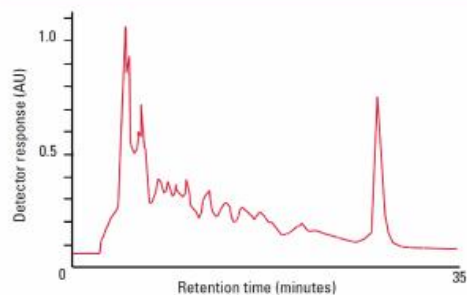
应用实例

图 17. AIEC 分离质粒载体



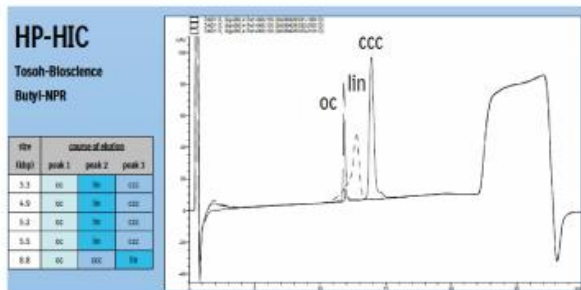
色谱柱: TSKgel DNA-NPR (2.5 μ m, 4.6 mm ID \times 7.5 cm)
 洗脱液: 缓冲溶液 A: 20 mmol/L Tris-HCl (pH 9.0)
 缓冲溶液 B: 含有 1 mol/L NaCl 的缓冲溶液 A
 缓冲溶液 B: 从 50% 到 65% 的 10 CV 的线性梯度
 流速: 1 mL/min
 检测: UV (260 nm)
 样品: PUC19 质粒

图 18. pBR322 质粒粗样的分离



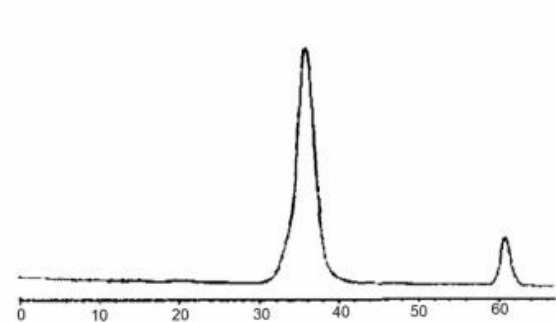
色谱柱: TSKgel DEAE-5PW (10 μ m, 7.5 mm ID \times 7.5 cm)
 流动相: A: 25 mmol/L Tris-HCl, 1 mmol/L EDTA, pH 8.0
 B: 25 mmol/L Tris-HCl, 1 mmol/L EDTA, pH 8.0 + 1 mol/L NaCl
 梯度: 流动相 B 从 25% 到 60% (30 分钟内)
 流速: 1 mL/min
 检测: UV (260 nm)
 温度: 25 $^{\circ}$ C
 样品: pBR322 质粒
 样品载量: 2.5 mg/1 mL

图 20. HIC 分离质粒拓扑异构体



色谱柱: TSKgel Butyl-NPR (2.5 μ m, 4.6 mm ID \times 3.5 cm)
 洗脱液 A: Tris-HCl-EDTA (pH 7.0) buffer containing ammonium sulfate (concentration may vary due to size of plasmid DNA)
 洗脱液 B: Tris-HCl-EDTA (pH 7.0)
 梯度: 线性梯度 (A \rightarrow B)
 流速: 0.5 mL/min
 检测: UV (260 nm)
 样品: 质粒
 Ref.: H. Schuchnig et al., HPLC 2008, poster

图 21. SEC 测定质粒含量



色谱柱: TSKgel G-DNA-PW+TSKgel G6000PWxl (7.8 mm ID \times 30 cm \times 2)
 洗脱液: 10 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0), 0.3 M NaCl, 1 mM EDTA
 柱温: 室温
 流速: 0.4 mL/min
 检测: UV (260 nm)
 样品: 质粒
 Ref.: 天然产物研究与开发 Nat Prod Res Dev 2009, 21: 1003-1006.

*如需更详细的资料，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