

使用Atlantis™ Premier BEH™ Z-HILIC色谱柱对包括假尿苷在内的RNA核苷三磷酸进行等度分离

Kenneth D. Berthelette, Jonathan E. Turner, Thomas Walter

Waters Corporation

摘要

近年来，合成RNA广受人们青睐，主要是作为一种生产治疗药物（包括针对SARS-CoV-2等病毒的疫苗）的途径。这项技术的快速发展导致参与创建和检测合成RNA的机构数量不断增加。在合成之前，必须先评估单个核苷酸的质量，确保生产出高质量的产品。此外，核苷酸很容易由三磷酸酯分解为二磷酸酯和单磷酸酯，可能会影响合成工艺的效率。因此，需要使用分析方法来检测这些关键起始化合物的分解产物。过去，核苷三磷酸的分析采用混合模式色谱柱或离子对反相色谱法进行。然而，亲水作用色谱法(HILIC)可为核苷酸分离提供若干优势，包括具有更高的MS灵敏度。本文所述研究开发出一种使用Atlantis Premier BEH Z-HILIC色谱柱分离四种主要RNA核苷三磷酸的方法。此外，还分析了经修饰的核苷酸三磷酸假尿苷，使其与同量异位的三磷酸尿苷获得了良好的分离，所用时间不到15分钟。

优势

- 使四种RNA核苷酸与一种常用的三磷酸尿苷修饰实现了基线分离
 - 能够在15 min内监测核苷酸降解情况的核苷酸等度分离方法
 - MaxPeak™高性能表面技术为核苷酸提供了良好峰形
-

简介

合成RNA，尤其是信使RNA (mRNA)，是一种将蛋白质引入生物系统的相对较新的技术。例如Pfizer和Moderna的SARS-CoV-2疫苗都用mRNA来制造刺突蛋白，引发免疫系统识别病毒，从而在发生实际感染时建立免疫反应¹。为表达特定蛋白质，首先必须创建正确的mRNA序列。mRNA改变可能导致蛋白质表达不足，从而使其无效。mRNA合成以及后续蛋白质表达的科学原理非常复杂。但是，这一复杂的过程只为实现一个目的：获得在普通人群使用时也能够达到预期性能的高质量mRNA产品。

在合成mRNA时，单个核苷酸必须按特定的顺序排列。而如果这些核苷酸不纯或形式错误（即，是单磷酸酯而非三磷酸酯），可能会影响mRNA的合成。这正是在合成过程中使用高纯度核苷酸至关重要的原因。为确保核苷酸的纯度尽可能高，一种方法是使用LC-UV或LC-MS进行检测，以确定在引入合成过程之前是否存在任何降解物或其他杂质。反相液相色谱法无论是否使用离子对试剂，都是保留和表征核苷酸的惯用方法²⁻⁴。虽然这些技术所达成的分离结果尚可，但使用HILIC能够更进一步的改善结果。HILIC专为保留和分离极性分析物而设计，无需使用离子对试剂，能够避免液质联用(LC-MS)分析所面临的棘手问题。此外，由于HILIC流动相中使用的有机溶剂含量高，MS电离更有效，从而导致MS信号高。如之前的文章所述，HILIC法能够分离核苷酸⁵。所引用的研究报道了一种分离所有12种核苷酸的方法，但运行时间长达50分钟，并需要使用复杂的流动相。合成过程中所用来料的分离应尽快进行，可能一次只能分离一种核苷酸或一个核苷酸家族。

本文所述研究介绍RNA核苷三磷酸的分离，目的是创建一种用于来料质量控制的快速方法。优先关注核苷酸的分离，尤其是同量异位化合物三磷酸假尿苷和三磷酸尿苷的分离。

实验

样品描述

使用以下样品稀释剂制备浓度为1 mg/mL的核苷酸储备液。对于三磷酸腺苷，需要使用30:70水:乙腈。使用25:75水:乙腈制备三磷酸胞苷、三磷酸尿苷和三磷酸鸟苷溶液。使用90:10乙腈:水作为稀释剂，制备含有50 µg/mL各核苷酸的样品混合物。用93:7乙腈:水将三磷酸假尿苷储备液(100 mM aq)稀释100倍以备分析，然后单独进样以避免潜在的共洗脱。

液相色谱条件

液相色谱系统:	ACQUITY™ UPLC™ H-Class PLUS, 配备四元溶剂管理器(QSM)、样品管理器 - Flow Through Needle (SM-FTN)、色谱柱管理器以及辅助色谱柱管理器和PDA检测器
检测条件:	UV 260 nm
色谱柱:	Atlantis Premier BEH Z-HILIC 2.1 × 100 mm, 2.5 μm (P/N: 186009986)
柱温:	20 °C
样品温度:	10 °C
进样体积:	1.0 μL
流速:	0.2 mL/min (除非另有说明)
等度条件:	30:70 v/v水:乙腈, 含20 mM乙酸铵, pH 9.0 (除非另有说明)

数据管理

色谱软件:	Empower™ 3 Feature Release 4
-------	------------------------------

结果与讨论

基于先前发表的分离方法, 选用Atlantis Premier BEH Z-HILIC色谱柱⁵。采用不同的配置, 在不牺牲分离性能的情况下缩短系统运行时间, 同时也使分离适用于质量控制常用的UHPLC和HPLC仪器。此外, 使用稍高的缓冲液浓

度(20 mM)来改善峰形。利用配备PDA的ACQUITY UPLC H-Class PLUS系统获得UV分析结果。测试的第一种条件是使用 2.1×100 mm, $2.5 \mu\text{m}$ 色谱柱发表的条件 (图1)。

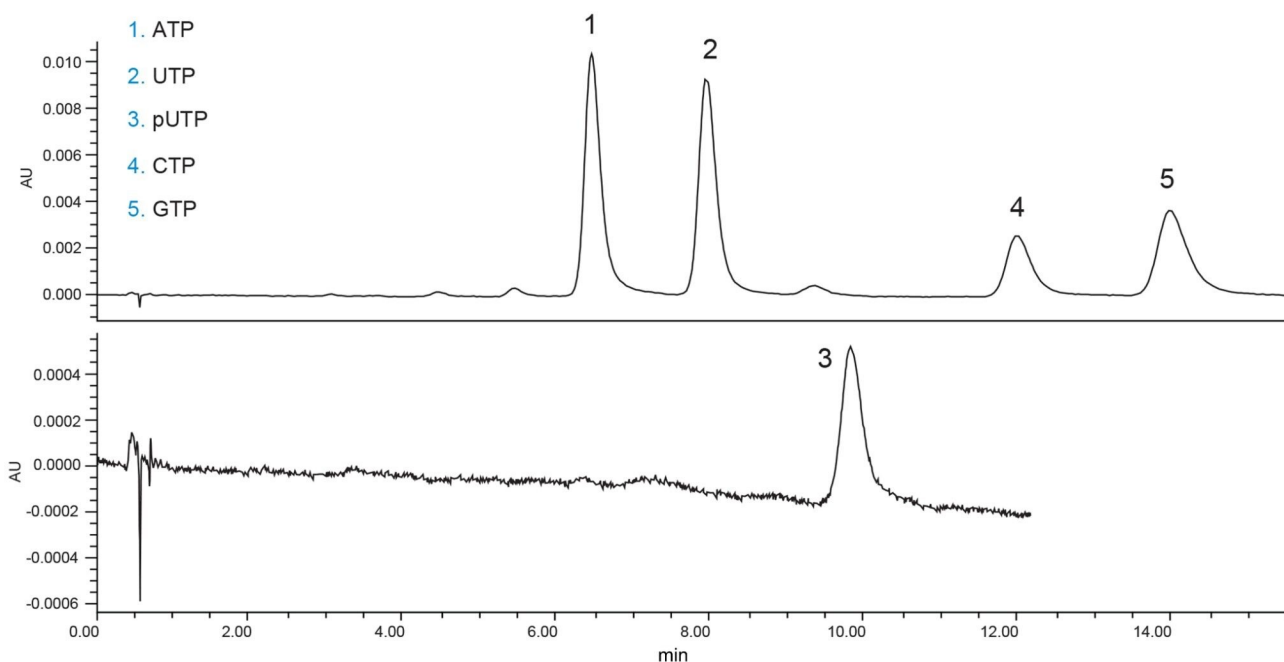


图1.RNA核苷酸在Atlantis Premier BEH Z-HILIC 2.1×100 mm, $2.5 \mu\text{m}$ 色谱柱上的分离结果。流动相为含20 mM乙酸铵的25:70:5 v/v/v水:乙腈:甲醇(pH 9.0), 流速为0.4 mL/min, UV检测波长为260 nm。

文献记录的方法条件能够分离五种目标化合物, 但是三磷酸假尿苷(pUTP)在这些条件下的UV信号非常弱。此外, 三磷酸胞苷(CTP)和三磷酸鸟苷(GTP)均出现轻微拖尾和宽峰。需要注意的是, 未标记的小杂质峰是核苷三磷酸的二磷酸酯或单磷酸酯形式。无需经过任何进一步优化, 该方法即适用于对来料核苷酸进行质量控制检测。但是, 分离结果在峰形和系统运行时间方面均得到改善。图2展示了化合物在流动相中不含甲醇助溶剂的条件下的分离结果。去除甲醇简化了流动相制备并改善了峰形。

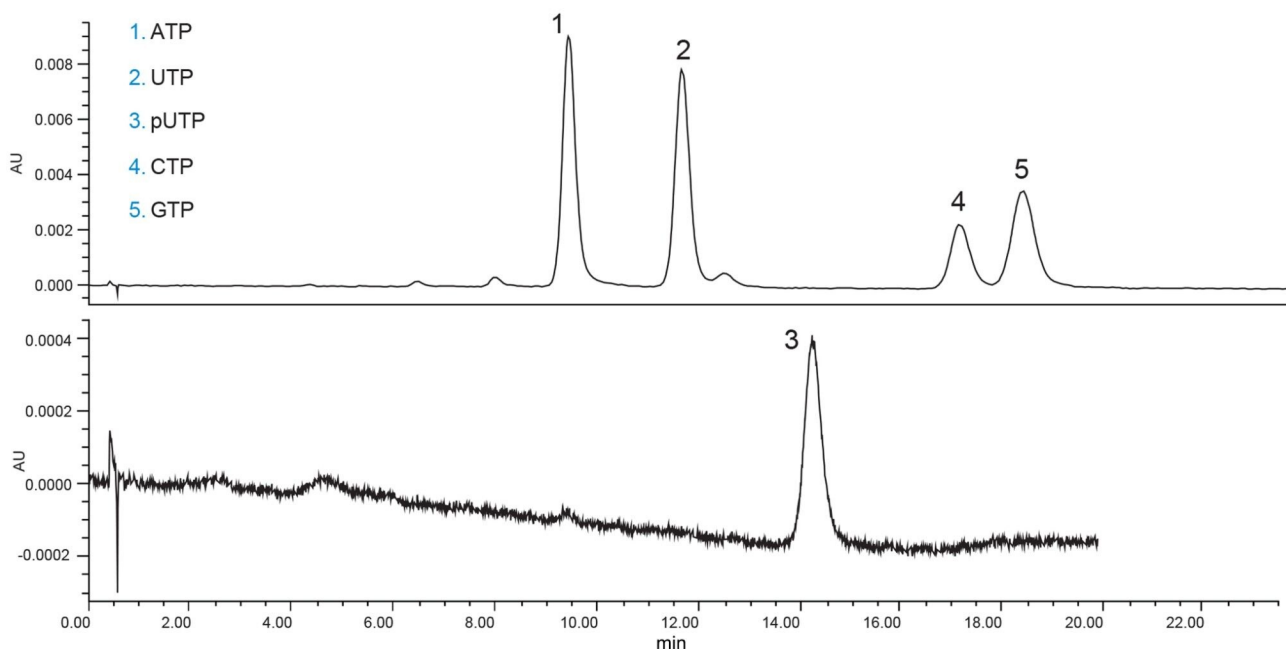


图2. RNA核苷酸在Atlantis Premier BEH Z-HILIC $2.1 \times 100 \text{ mm}$, $2.5 \mu\text{m}$ 色谱柱上的分离结果。流动相为含20 mM乙酸铵的25:75 v/v水:乙腈(pH 9.0), 流速为0.4 mL/min, UV检测波长为260 nm。

通过去除流动相中的甲醇并保持水含量不变(25%), 流动相比存在甲醇时弱。由此导致洗脱时间更长, 在本例中, 保留时间几乎增加50%。这一结果并不理想, 但CTP和GTP的峰形有所改善。mpUTP和UTP峰的洗脱时间仍然非常接近, 但如果需要, 通过MS可以轻松区分两者。优先考虑缩短系统运行时间, 因此接下来通过增加流动相的水含量来优化该方法(图3)。

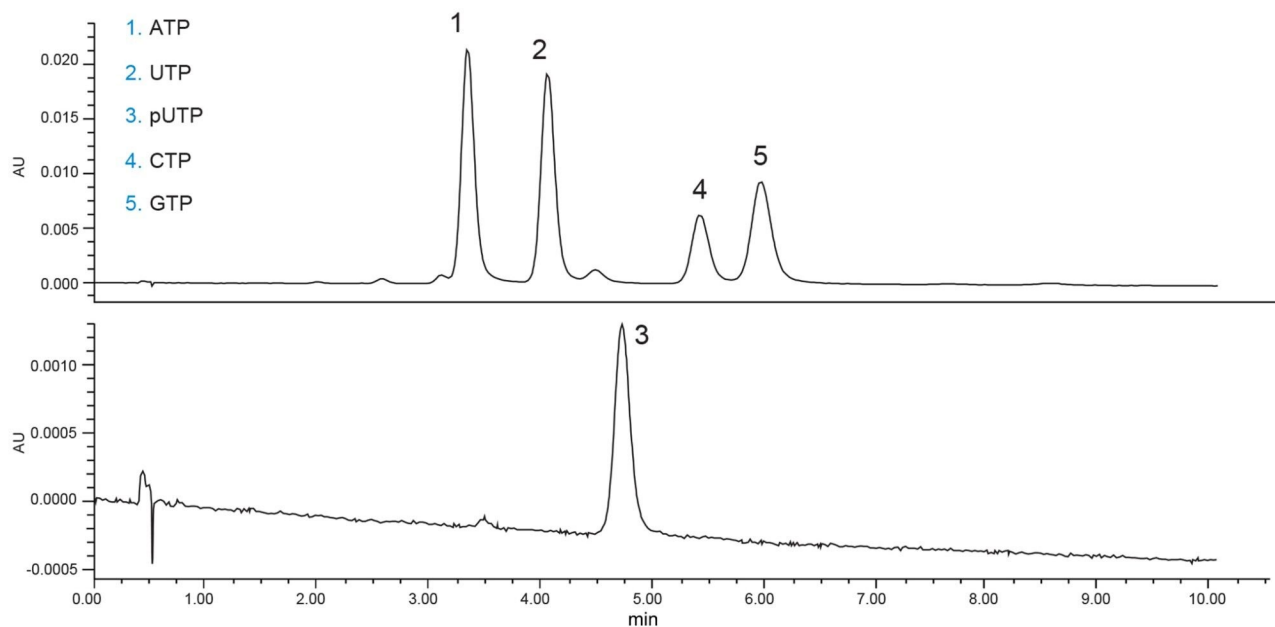


图3.RNA核苷酸在Atlantis Premier BEH Z-HILIC 2.1×100 mm, $2.5 \mu\text{m}$ 色谱柱上的分离结果。流动相为含20 mM乙酸铵的30:70 v/v水:乙腈(pH 9.0), 流速为0.4 mL/min, UV检测波长为260 nm。

增加流动相中的含水量缩短了保留时间, 同时保持了良好的峰形。一些杂质与核苷酸共洗脱, 最明显的是紧接在三磷酸腺苷(ATP)之前洗脱的峰, 它是一种二磷酸酯杂质。如果单独分析核苷酸, 这些杂质将与各自的三磷酸酯前体得到很好的分离。在这些条件下, 分离效果非常出色, 但一些杂质峰与三磷酸酯主峰之间的轻微共洗脱并不理想。最后一个优化步骤是降低分离的流速, 由此提高柱效, 以增加系统运行时间为代价改善总体分离效果。图4展示了以0.2 mL/min的流速得到的核苷酸分离结果。

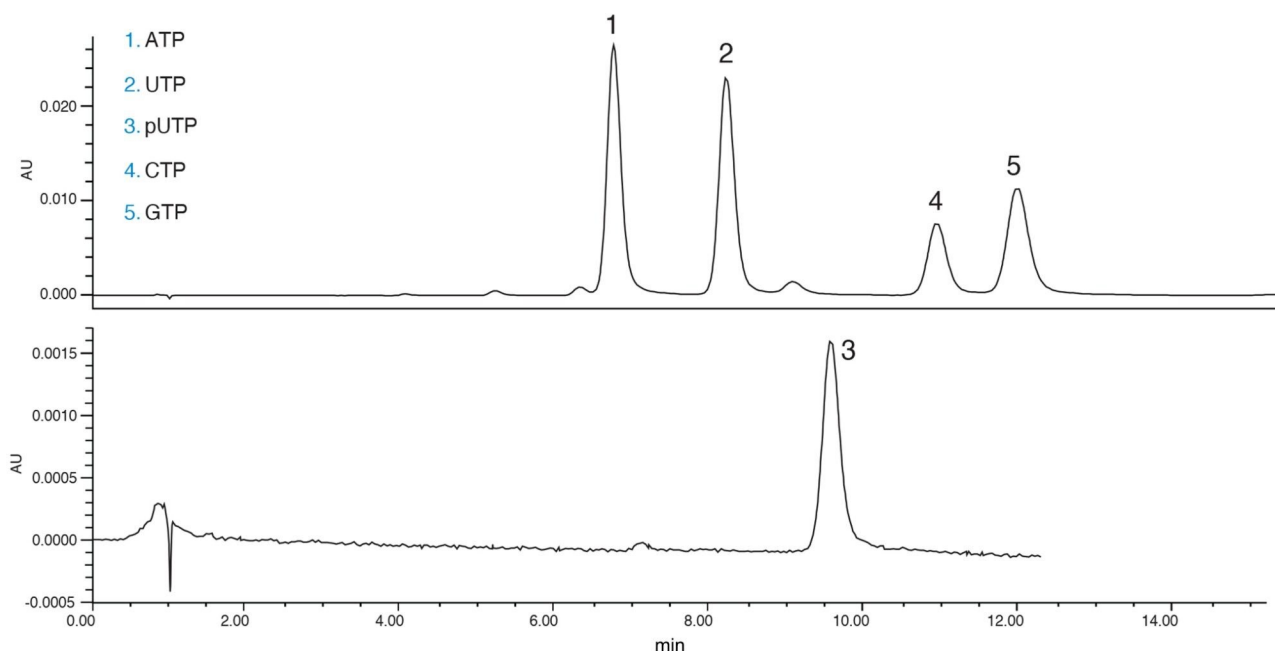


图4. RNA核苷酸在Atlantis Premier BEH Z-HILIC $2.1 \times 100 \text{ mm}$, $2.5 \mu\text{m}$ 色谱柱上的分离结果。流动相为含20 mM乙酸铵的30:70 v/v水:乙腈(pH 9.0), 流速为0.2 mL/min, UV检测波长为260 nm。

降低流速后, mpUTP和UTP的分离效果有所改善。此外, ATP与在它之前洗脱的降解物实现了更高的分离度。使用这些条件, 五种主要的目标核苷酸得到分离。这些条件也可用于分析核苷酸来料样品, 在确定纯度后用于mRNA的合成。

结论

采用逐步法开发出一种分离RNA核苷三磷酸的HILIC方法, 使四种主要的三磷酸RNA以及常用的三磷酸假尿苷获得基线分离。该方法用途广泛, 包括对用于RNA合成的核苷三磷酸进行质量控制。

HILIC分离使用的流动相简单, 由包含20 mM乙酸铵(pH 9.0)的70:30 v/v乙腈:水溶液组成。此组合适用于MS和UV检测。利用MaxPeak Premier高性能表面(HPS)技术使化合物获得了良好的峰形, 该技术减轻了酸性部分(如磷酸基团)与LC系统和色谱柱中金属表面之间的离子相互作用⁵。通过采用该技术的Atlantis Premier BEH Z-HILIC色谱柱, 只需单次运行即可让所有五种核苷酸获得良好的分离结果。

参考资料

1. Xu S, Yang K, Li R, Zhang L. mRNA Vaccine Era- Mechanisms, Drug Platform and Clinical Prospection. *International Journal of Molecular Sciences*.(2021) 6582.
2. Werner A. Reversed-phase and Ion-Pair Separations of Nucleotides, Nucleosides, and Nucleobases: Analysis of Biological Samples in Health and Disease. *Journal of Chromatography B: Biomed and Science Applications*.(1993) 3–14.
3. Yang FQ, Li DQ, Feng K, Hu DJ, Li SP. Determination of Nucleotides, Nucleosides and Their Transformation Products in Cordyceps by Ion-Pairing Reversed-Phase Liquid Chromatography-mass spectrometry. *J. Chrom A*. (2010).5501-5510.
4. Smith K, Rainville P. 利用MaxPeak高性能表面和Atlantis Premier BEH C₁₈ AX色谱柱提高LC-MS分析的灵敏度. 沃特世应用纪要, [720006745ZH](#), 2020.
5. Walter TH, Alden BA, Belanger JL, Berthelette K, Boissel C, Delano M, Kizekai L, Nguyen JM, Shiner SJ. Modifying the Metal Surfaces in HPLC Systems and Columns to Prevent Analyte Adsorption and Other Deleterious Effects. *LCGC* (June 2022) 28-34. Accessed 6-July-2022
<https://www.chromatographyonline.com/view/modifying-the-metal-surfaces-in-hplc-systems-and-columns-to-prevent-analyte-adsorption-and-other-deleterious-effects> <
<https://www.chromatographyonline.com/view/modifying-the-metal-surfaces-in-hplc-systems-and-columns-to-prevent-analyte-adsorption-and-other-deleterious-effects>> .

特色产品

ACQUITY UPLC H-Class PLUS系统 <<https://www.waters.com/10138533>>

ACQUITY UPLC PDA检测器 <<https://www.waters.com/514225>>

Empower色谱数据系统 <<https://www.waters.com/10190669>>

720007704ZH, 2022年8月

© 2022 Waters Corporation. All Rights Reserved.

[使用条款](#)

[隐私](#)

[商标](#)

[网站地图](#)

[招聘](#)

[Cookie](#)

[Cookie](#)

[设置](#)