

5种三磷酸核苷酸单体的IP-RP分离

陆珺

应用及技术服务部

天津博纳艾杰尔科技有限公司, 天津开发区西区南大街179号, 300462

概述

mRNA 药物生产工艺大致可分为 5 个模块: 质粒生产, 质粒线性化, 体外转录合成反应 (IVT), mRNA 纯化, LNP 包封。针对mRNA的批量合成, 目前较为高效的方式为体外转录 (In Vitro Transcription, IVT)。IVT是一个相对复杂的酶催化过程, 在合成mRNA的过程中, 除DNA模板外, 需加入所需的酶、三磷酸核苷酸及其它相关试剂。

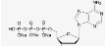
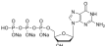
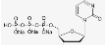
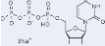
三磷酸核苷酸极性很强, 在反相色谱上保留很弱, 由于结构非常相似, 不能实现良好分离。在本应用中, 通过添加离子对试剂来增强三磷酸核苷在C18色谱柱上的保留并改善分离。本文对比了两款分析寡核苷酸专用的C18色谱柱, Biozen Oligo 和Clarity Oligo-RP。前者采用2.6um核壳颗粒结合生物惰性的Bio-Ti柱硬件; 后者为3um全多孔杂化硅胶颗粒。结果表明, 两款色谱柱在该色谱条件下均可以将A、G、C、T、U这5种三磷酸核苷酸单体分离。

关键词

三磷酸核苷酸; 离子对反相; bioZen oligo; Bio-Ti钛合金; Clarity Oligo

化合物信息

表1. 化合物信息

中文名称	英文名称	CAS号	分子式	分子量
三磷酸腺苷	dATP	54680-12-5		557.13
三磷酸鸟苷	dGTP	93919-41-6		573.13
三磷酸胞苷	dCTP	109909-44-6		533.10
三磷酸尿苷	UTP	19817-92-6		550.09

三磷酸胸苷	dTTP	27821-54-1		548.12
-------	------	------------	---	--------

实验部分

3.1仪器、试剂与材料

3.1.1主要仪器设备

超高效液相色谱仪(Waters H-Class);

3.1.2试剂材料

色谱柱1: Biozen Oligo 2.6um, 4.6*150 mm;

色谱柱2: Clarity Olig- RP 3um, 4.6*150mm;

三乙胺, 正己胺, 磷酸为分析纯, 乙腈为HPLC级, 屈臣氏蒸馏水

3.1.3样品前处理方法

供试品溶液: 取表一5种化合物原液 (100mM) 各20uL混合后, 用纯水稀释成含各组分2mM的混标。

3.2色谱柱条件

色谱柱1: Biozen Oligo (4.6*150 mm, 2.6um); P/N: 00F-4790-E0

色谱柱2: Clarity Olig- RP (4.6*150 mm, 3um); P/N: 00F-4441-E0

流动相A: 150mM三乙胺+15mM正己胺 (用磷酸调节pH至7.8)

流动相B: 流动相A: 乙腈 (1: 1)

梯度程序见表2:

表2. 梯度条件

时间 (min)	A (%)	B (%)
0	85	15
20	75	25
20.1	85	15
25	85	15

流速: 0.8 mL/min;

检测器: 260 nm

柱温：50℃；
自动进样器温度：8℃
进样量：1 μL

3.3结果

表3.色谱柱1 Biozen Oligo实验结果

保留时间	英文名称	分离度	拖尾因子	塔板数
6.245	dCTp	--	0.82	22757
7.110	UTP	5.0513	0.86	28494
8.840	dGTP	9.3828	0.87	34757
10.610	dTTP	8.4801	0.94	39427
11.956	dATP	5.8960	0.96	44669

表4.色谱柱2 Clarity Oligo-RP 实验结果

保留时间	英文名称	分离度	拖尾因子	塔板数
9.777	dCTp	--	0.97	19254
11.019	UTP	4.8223	0.92	36475
12.978	dGTP	8.3568	0.95	49758
14.960	dTTP	8.1348	1.01	58343
16.031	dATP	4.2461	1.02	65947

3.4实验谱图

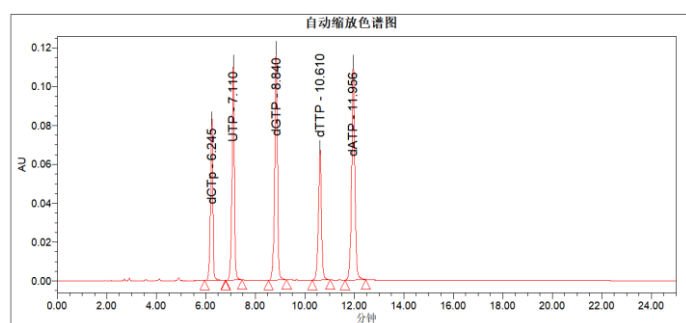


图1.色谱柱1 Biozen Oligo混标谱图

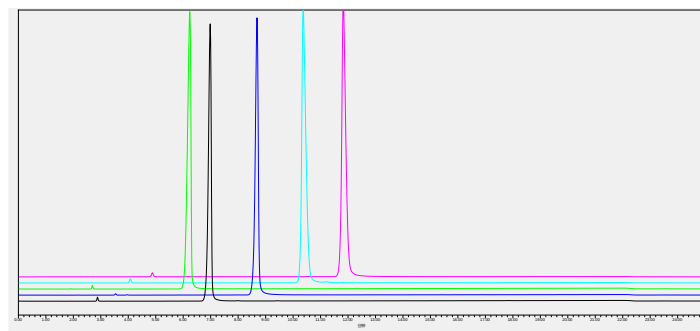


图2. Biozen Oligo色谱柱五个单标定位

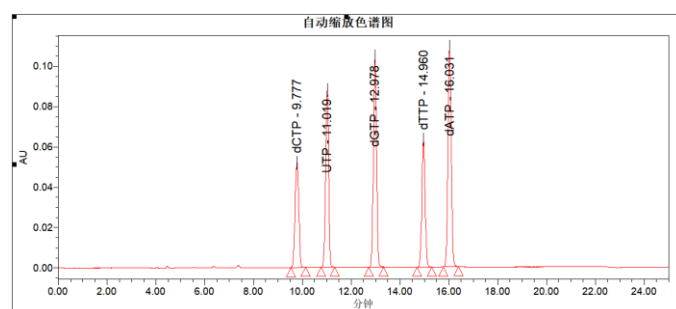


图3.色谱柱2 Clarity Oligo-RP混标谱图

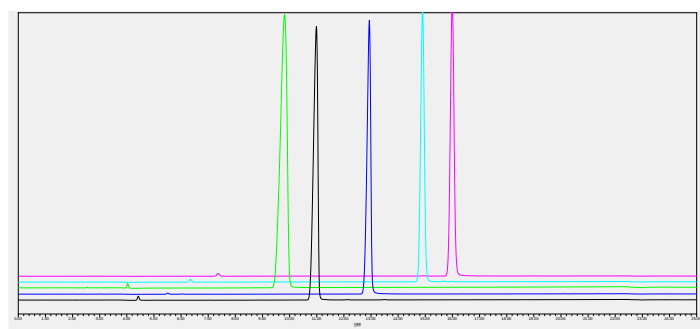


图4. Clarity Oligo-RP色谱柱五个单标谱图

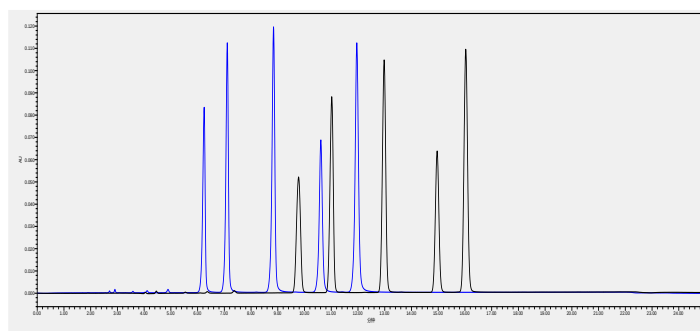


图5 柱1和柱2 混标对比谱图

3.5 讨论

本实验采用Biozen Oligo 2.6um 和Clarity Olig-RP 3um两款色谱柱对5种三磷酸核苷酸单体进行分离。因为三磷酸核苷酸的亲水性很强，在磷酸盐缓

冲体系下的保留偏弱，分离度也不好。在反相离子对条件下可以发现保留明显增强，并且5个单体都可以很好的分离。

Biozen Oligo为2.6um的核壳颗粒，跟3um全多孔硅胶颗粒的Clarity Oligo-RP相比，可以看到峰更加尖锐，柱效和分离度更高；而后者的保留略强，峰的对称性更好。

反相离子对色谱条件需要在流动相中添加烷基胺类离子对试剂，流动相的pH比较高。如果是传统的硅胶颗粒C18柱，对寿命会有挑战。Biozen Oligo 2.6um 和Clarity Olig- RP 3um两款色谱柱均采用杂化硅胶技术，技术，使得色谱柱可以耐受1-12的pH，使得色谱柱经久耐用。

结论

实验结果表明，Biozen Oligo 2.6um 和Clarity Olig- RP 3um两款色谱柱可以有效的分离5种三磷酸核苷酸单体。这个方法可以同时分析5种单体，在IVT的原料的质控和检测中，可以节省时间提高效率。





Xccelerator 加速服务

探索分离, 使命加速

Mission to Accelerate Separation

在新药、仿制药研发和科学研究过程中, 抢占先机越来越多被大家提及, 同时在食品、环境、临床等行业的客户也都面临着项目周期压缩的压力。基于此, 我们成立了上海和天津两个方法开发服务中心, 为客户加快项目进度提供支持。

Xccelerator 以客户为中心, 以色谱技术为中心, 为药物研发和科学研究提供全方位加速服务。

三大研发中心

中国天津

地址: 天津市开发区西区南大街179号

电话: 400-606-8099

邮箱: cninfo@phenomenex.com

中国上海

地址: 上海市长宁区福泉北路518号1号楼1层

电话: 400-606-8099

邮箱: cninfo@phenomenex.com

美国总部

地址: 411 Madrid Avenue Torrance, CA 90501-1430, USA

Tel: +1 (310) 212-0555

Fax: +1 (310) 328-7768

Email: cninfo@phenomenex.com

仅用于研究目的, 不可用于临床诊断程序。

© 2022 天津博纳艾杰尔科技有限公司保留所有权利。



如果您对于本方法的执行有任何问题, 或想要了解更多信息,
请拨打400-606-8099 联系我们的技术专家, 我们很乐意为您提供帮助!

Confidential — Company Proprietary

