

生物惰性超高效液相色谱仪测定 siRNA 含量

LC-348

摘要： 本文采用岛津生物惰性超高效液相色谱仪建立了小干扰 RNA(siRNA) 定量方法。结果表明：生物惰性液相色谱管路经 peek 材料内衬后，全流路不含不锈钢材质，可以抑制金属吸附，因此 siRNA 在此系统中无残留。在 1~100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 线性范围内线性良好，线性相关系数为 0.9998。精密度实验中，2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 标准溶液保留时间 RSD 小于 0.08%，峰面积 RSD 小于 2.70%。分析实际 siRNA 制剂样品，测定样品中 siRNA 含量为 1.21 mg。实验结果表明，该方法能快速准确地定量分析 siRNA。

关键词： 生物惰性超高效液相色谱仪 Metal free 色谱柱 siRNA

siRNA (Small interfering RNA)，小干扰核苷酸，是由 20-25 个核苷酸组成的双链 RNA，siRNA 作用于 mRNA，通过基因沉默抑制靶蛋白表达，在癌症、遗传及代谢等疾病的治疗中具有广阔的前景。

siRNA 中含磷酸基团，与金属接触时易产生吸附现象。常规高效液相色谱仪由于不锈钢管路等部件与 siRNA 接触时产生吸附作用，影响色谱峰峰形，且易产生残留，从而影响定量准确性。除液相色谱仪外，常

规液相色谱柱也是金属吸附的重灾区，因为色谱柱筛板为网状不锈钢材质，含磷酸基团的 siRNA 易吸附残留在色谱柱柱头。

本方法采用岛津最新推出生物惰性超高效液相色谱仪，在保证超高耐压的前提下，管路经 peek 材料内衬，实现全流路无不锈钢材质，抑制金属吸附。色谱柱采用 Metal free 色谱柱，抑制 siRNA 在色谱柱中的吸附，实现快速、准确定量分析 siRNA。

■ 实验部分

1.1 仪器

生物惰性超高效液相色谱仪 LC-40D XSi，具体配置信息如下：

系统控制器：CBM-40

输液泵：LC-40D XSi

检测器：UV

自动进样器：SIL-40C XSi

脱气机：DGU-405

色谱工作站：Labsolutions Ver. 5.114



图 1 生物惰性超高效液相色谱仪

1.2 分析条件

色谱柱：Shim-Pack Scepter C18-120[Metal free] (50 mm×2.1 mm I.D., 3μm) ，
岛津（上海）实验器材有限公司，P/N: 227-31073-01

流动相：A-15mM TEA+400mM HFIP； B-50%A+50% 甲醇

流速：0.3 mL/min

进样体积：1 μL

柱温：55°C

检测器：UV

检测器温度：40°C

检测波长：260 nm

洗脱方式：梯度洗脱，B 相起始浓度为 20%，时间程序如表 1 所示。

表 1 梯度洗脱时间程序

时间 (min)	单元	处理命令	值
5	泵	B.Conc	80
8	泵	B.Conc	80
8.1	泵	B.Conc	20
15	控制器	Stop	

1.3 标准品及样品配制

标准品储备液：称取标准品适量，用超纯水溶解稀释成 1 mg/mL；

标准溶液：取适量对照品储备液，用超纯水逐级稀释，配制浓度为：1、2、5、10、20、50、100 μg/mL 的标准溶液。

冻干制剂样品处理：取 2 mL 超纯水溶解样品，用碱性溶液稀释 40 倍，放置 15 min，将递送介质和 siRNA 解离，上机分析。

■ 结果与讨论

2.1 标准溶液色谱图

siRNA 为双链 RNA，在有机溶剂和高温作用下解离，故色谱图中为双峰，色谱图见图 2。

siRNA 含磷酸基团，易在不锈钢管路和金属色谱柱中产生金属吸附，导致残留，影响定量准确性，采用常规超高效液相色谱仪和金属色谱柱，在 100 μg/mL 标准溶液后，分析空白溶液中有残留，空白溶剂色谱图见图 3。本实验采用生物惰性液相色谱仪结合 metal free 色谱柱，全流路不含不锈钢材质，在校准曲线最高点（100 μg/mL）siRNA 标准溶液后分析空白溶剂，未检出 siRNA，无残留。

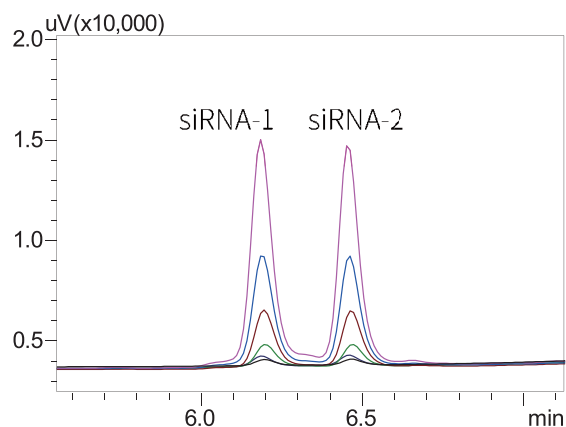


图 2 siRNA 色谱图（浓度 1~100 μg/mL）

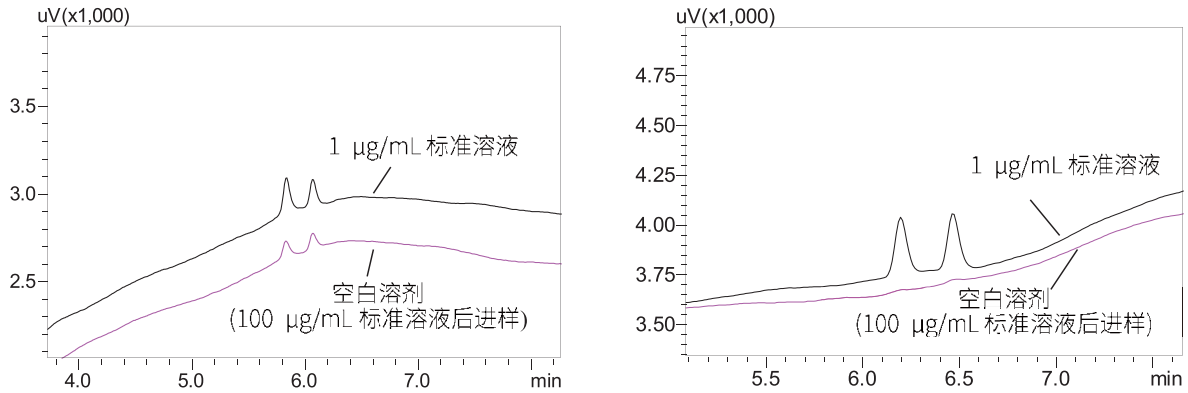


图3 空白溶剂与1 µg/mL 标准溶液色谱图比较
(左: LC-40D XS+Metal 色谱柱, 右: LC-40D XSi+Metal free 色谱柱)

2.2 校准曲线

按 1.2 中的分析条件测定标准溶液, 浓度为 1~100 µg/mL, 以浓度为横坐标, 两峰峰面积之和为纵坐标, 采用组校准外标法建立校准曲线, 校准曲线如图 4 所示, 线性相关性高、准确度高。

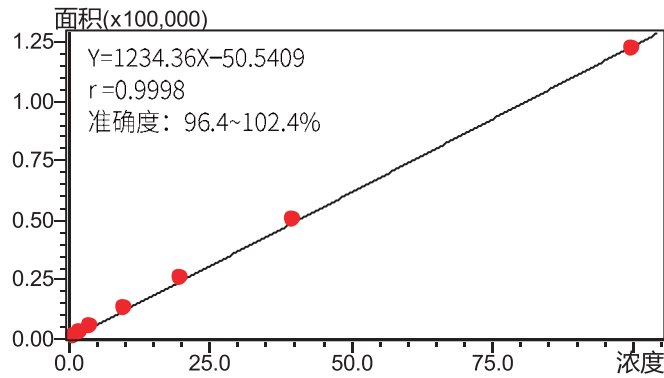


图4 校准曲线

2.3 精密度实验

按照 1.2 分析条件, 将浓度为 2 µg/mL 的标准溶液重复分析 6 次, 计算得到 siRNA 保留时间 RSD 小于 0.08%, 峰面积 RSD 小于 2.70%, 色谱图见图 5。

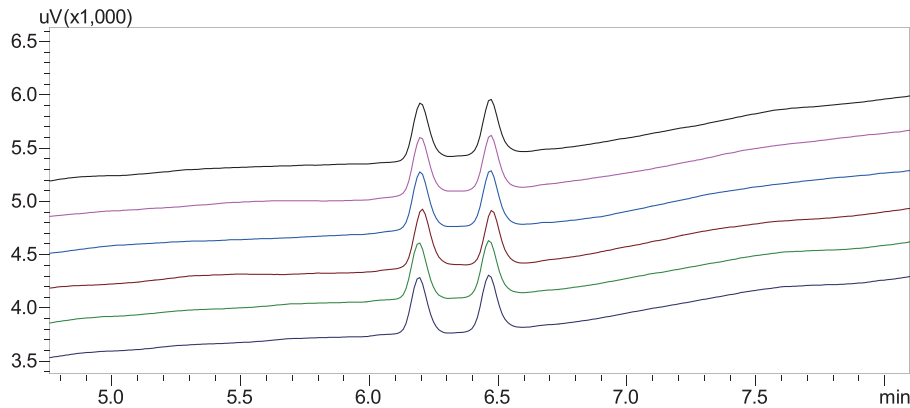


图5 精密度实验结果

2.4 样品含量测定

按照 1.3 中处理方法对 siRNA 冻干制剂样品进行处理, 连续分析 5 次, 考察前处理方法解离递送介质和 siRNA 的稳定性, 样品色谱图如图 6 所示, 定量结果如表 2 所示, 5 次连续分析含量 RSD 为 2.43%, 稳定性好。

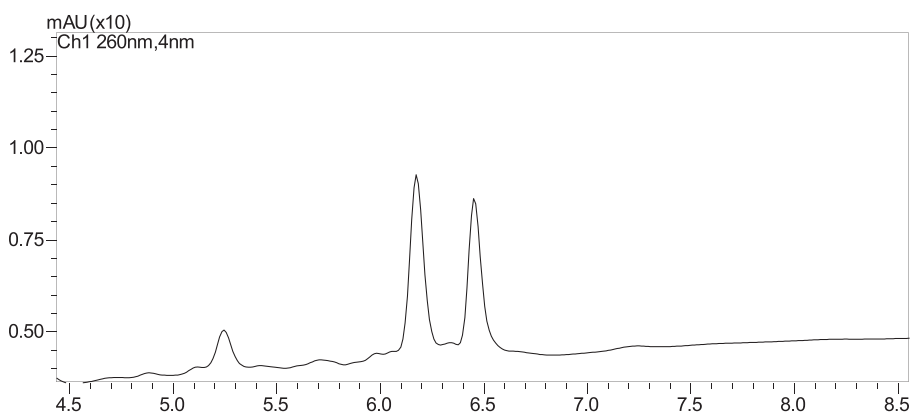


图 6 样品色谱图

表 2 样品中 siRNA 定量结果

项目	每份样品中 siRNA 量 (mg)					平均值 (mg)	RSD (%)
	1	2	3	4	5		
结果	1.23	1.21	1.24	1.21	1.16	1.21	2.43

■ 结论

本文采用岛津生物惰性超高效液相色谱仪建立了小干扰 RNA(siRNA) 定量方法。该方法中, siRNA 无残留, 在 1~100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 线性范围内线性良好, 线性相关系数为 0.9998。精密度实验中, 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 标准溶液保留时间 RSD 小于 0.08%, 峰面积 RSD 小于 2.70%。分析实际 siRNA 制剂样品, 测定样品中 siRNA 含量为 1.21 mg。实验结果表明, 该方法能快速准确地定量分析 siRNA。

岛津应用云

