

岛津生物药整体解决方案（二）

—核酸类药物和疫苗篇



前言

核酸是由核苷酸单体聚合而成的生物大分子化合物，为生命的最基本物质之一。分为脱氧核糖核酸（DNA）和核糖核酸（RNA），主要负责储存和传递遗传信息。核酸药物是具有特定碱基序列的药物，可以凭借其翻译或调控功能，治疗疾病。与小分子和抗体药物靶向蛋白质不同，核酸药物通常作用于蛋白质合成上游，即基因转录后、蛋白质翻译前的信使核糖核酸（mRNA）阶段，是一种从源头进行干预，抑制疾病相关基因表达为病理性蛋白，或引入能够表达正常蛋白的基因弥补功能蛋白的不足，“治标又治本”。此外，核酸药物还具有疗效显著、特异性强、开发周期短等优点，已经成为医药市场的热点，在治疗遗传性疾病、代谢疾病、肿瘤以及预防感染性疾病等领域有着巨大的潜力，被誉为继小分子化药和抗体药物后的新一代治疗药物。

核酸药物主要分为寡核苷酸和 mRNA 两大类。寡核苷酸药物是由十几个到几十个核苷酸组成的短链核酸，主要包括反义寡核苷酸（antisense oligonucleotide, ASO）、小干扰核糖核酸（small interfering RNA, siRNA）、微小核糖核酸（microRNA, miRNA）、核酸适配体（aptamer）等。目前研究较多的是反义寡核苷酸（ASO）和小干扰 RNA（siRNA），通过干预靶标基因表达来治疗疾病。2021 年 12 月，治疗罕见病脊髓性肌肉萎缩的反义寡核苷酸药物被纳入中国医保。同月，长效降血脂的 siRNA 药物 Leqvio 获 FDA 批准上市，实现一年两针持续有效降脂。寡核苷酸药物适应症已经由罕见病扩展到常见病领域，未来可期。mRNA 是由几千个核苷酸组成的长链核酸，分为 mRNA 疫苗和 mRNA 药物。mRNA 疫苗可在人体内表达抗原蛋白，诱导机体产生特异性免疫应答，达到预防免疫的作用。自 2021 年首个 mRNA 疫苗获批上市以来，mRNA 疫苗高保护率、针对病原体变异反应速度快、研发周期短等优点，引发全球密切关注，发展迅猛。mRNA 药物可以通过特定序列的 mRNA，在病人体内细胞中生产需要的药物，如补偿缺少的基因或蛋白质，或转化成单克隆抗体、酶和细胞因子等蛋白质药物，从而实现治疗目的。mRNA 既可预防，也可治疗疾病，作为突破性技术平台，有望部分替代传统疫苗和药物，开拓出新的治疗领域，带来新的疗法变革。

寡核苷酸药物通常经固相化学合成生产，mRNA 疫苗通常通过基因工程生产，在开发和生产中均需要进行产品和工艺相关杂质的检测和评估，以保证药物质量可靠并且安全有效。寡核苷酸药物目前主要参照小分子药物质量研究的相关要求进行质量分析。mRNA 疫苗质量评估已有一系列的指南可参考，例如国家药品监督管理局（NMPA）药品审评中心于 2020 年 8 月颁布的《新型冠状病毒预防用 mRNA 疫苗药学研究技术指导原则（试行）》和美国药典（USP）于 2022 年 2 月发布的“mRNA 疫苗质量分析方法”指南草案。

作为全球知名的实验室分析测试服务供应商，岛津致力于提供技术领先的仪器设备及全面可靠的综合方案。岛津始终密切关注核酸药物分析需求，使用多种仪器（MALDI-TOF、Q-TOF、单四极杆液质联用仪、生物惰性液相系统、Tm 分析系统、扫描探针显微镜等），开发了一系列寡核苷酸药物（分子量、碱基序列、纯度、原料质控、Tm 分析等）、mRNA 疫苗（加帽率、纯度、原料质控、形态、质粒分析等）和核酸药物递送系统分析方法，汇编并推出《核酸药物应用文集》，以供相关客户参考。

岛津企业管理（中国）有限公司
分析中心

目 录

一、 岛津生物技术药物整体解决方案	1
二、 寡核苷酸药物分析	7
LCMS 测定反义寡核苷酸分子量	8
LCMS 测定小干扰核苷酸 siRNA 分子量	12
MALDI-8020 快速检测寡核苷酸药物的分子量及杂质	18
MALDI-8030 分析寡核苷酸序列和 LCMS-9030 分析寡核苷酸精确分子量	21
使用双极性台式 MALDI-8030 进行合成寡核苷酸的负离子模式分析	25
使用 LabSolutions Insight™ Biologics 进行寡核苷酸杂质分析	29
利用超高效液相色谱-四极杆飞行时间质谱进行寡核苷酸分子量测定和序列确认	34
生物惰性超高效液相色谱仪测定 siRNA 含量	38
利用生物惰性液相分析 GalNAc 偶联的寡核苷酸药物纯度	42
离子交换色谱法分析寡核苷酸并考察流动相 pH 变化对分离的影响	45
采用 Tm 分析系统分析核酸药物解链温度	49
三、 mRNA 疫苗分析	53
应用台式 MALDI-TOF MS 对共转录加帽后 mRNA 的帽子端进行定性分析	54
应用 MALDI-8030 负离子模式对 mRNA 酶法加帽反应产物进行定性分析	57
应用台式 MALDI-TOF MS 分析 mRNA 和 DNA 生产用核苷酸原料的分子量及组成	61
应用台式 MALDI-TOF MS 分析 mRNA 药物及疫苗生产所用核酸原料的分子量及组成	65
通过抑制金属吸附提高核苷酸分析重现性和定量准确性	68
使用生物惰性液相评价 mRNA 疫苗分析方法重复性与残留量	71
生物兼容液相用于 mRNA 疫苗纯度分析	75
扫描探针显微镜(SPM)表征 mRNA 疫苗样品的表面形貌	79
生物惰性液相色谱分析三种构型的质粒样品	82
四、 核酸药物递送系统分析	85
生物兼容液相 Nexera Bio 联合蒸发光散射检测器测定 mRNA 递送介质脂质纳米粒 LNP 中四种成分的含量	86
生物兼容液相 Nexera Bio 联合蒸发光散射检测器测定 mRNA 递送介质 DMG-PEG2000 的含量	90
高效液相色谱仪联合蒸发光散射检测器测定 siRNA 递送介质聚乙烯亚胺	94
应用台式 MALDI-TOF MS 分析 mRNA 药物递送系统脂质纳米粒的原料分子量	97
应用台式 MALDI-TOF MS 分析 mRNA 药物递送基质 DMG-PEG2000 的分子量分布及组成	100

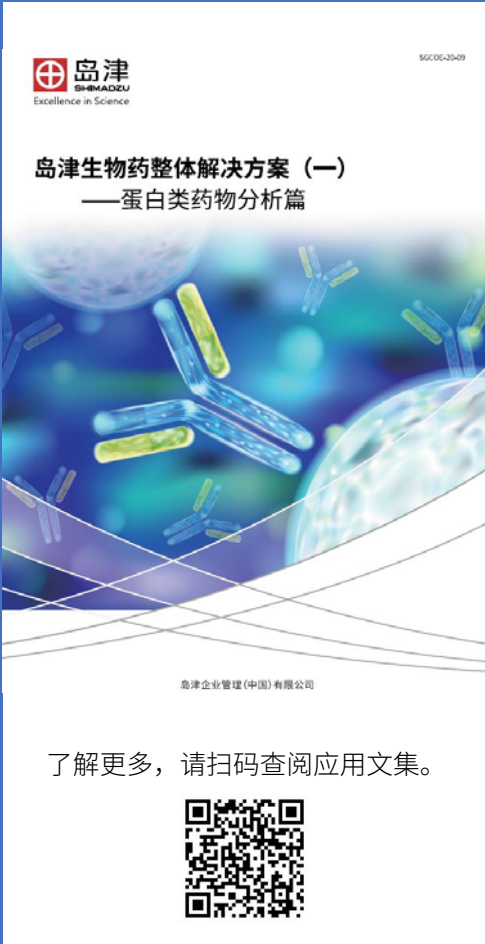

一、岛津生物技术药物整体解决方案

生物技术药物（以下简称生物药）是指采用 DNA 重组技术或者其他创新生物技术生产的一大类预防、诊断和治疗疾病的药物，如蛋白质类生物药（单克隆抗体、融合蛋白、细胞因子、激素、酶等）、基因/细胞治疗药物（mRNA、寡核苷酸、病毒载体类基因治疗药物、非病毒载体类基因治疗药物、细胞治疗产品等）。

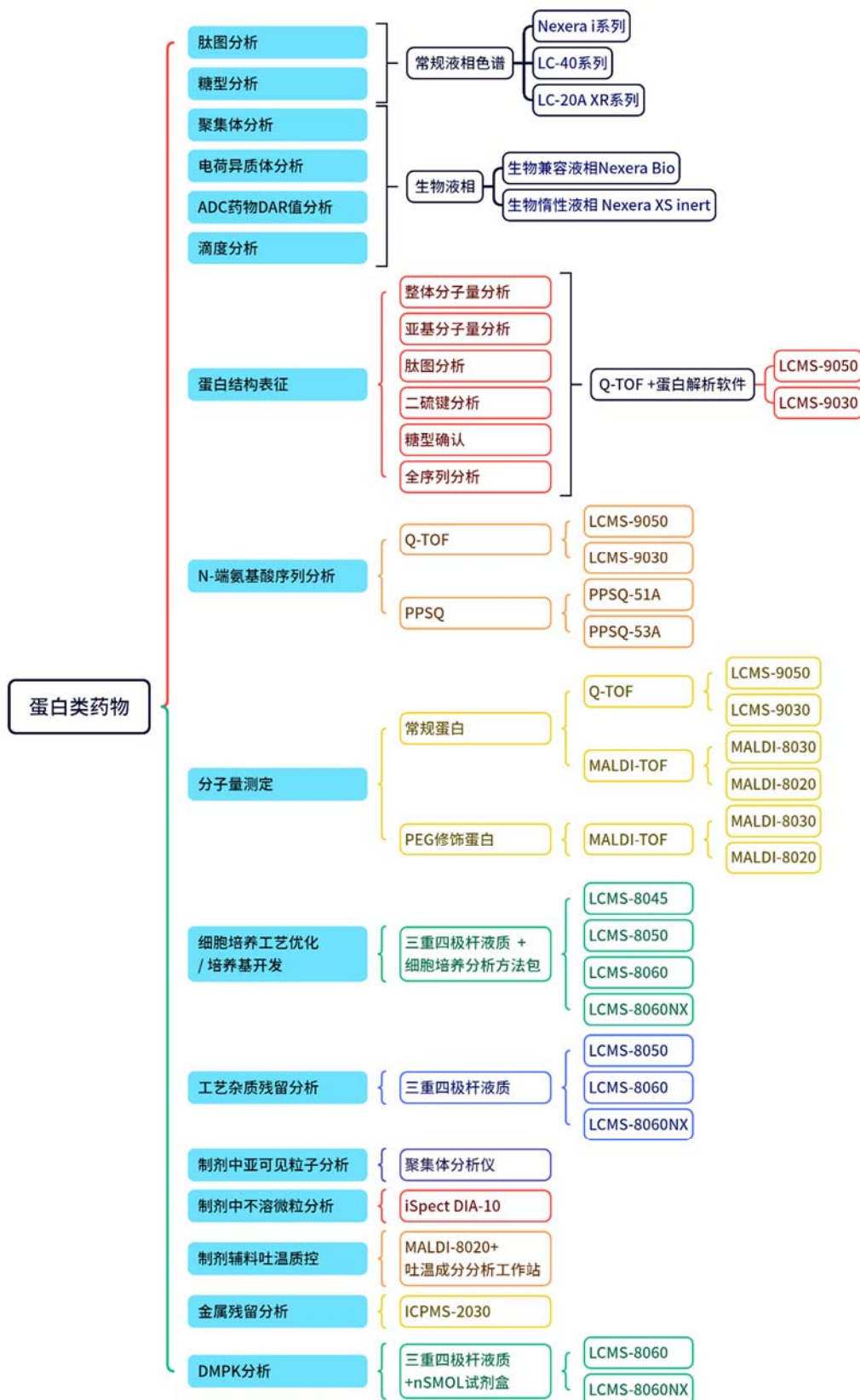
基于质量源于设计（QbD）的理念，在生物药研发到生产的全过程均需进行质量研究与控制，以确保产品的安全、有效。岛津公司紧跟行业发展，密切关注生物药质量研究和控制需求，不断钻研先进的分析技术，开发了生物药整体解决方案，包括《蛋白类药物分析篇》、《核酸类药物和疫苗篇》、《细胞培养上清液和培养基分析篇》、《生物药杂质和辅料分析篇》四个分册，助力生物药的研发与质控，其他分册持续更新中。

1. 《岛津生物药整体解决方案（一）—蛋白类药物分析篇》

蛋白类药物，以单克隆抗体为例，我们已开发了涉及研发、生产工艺开发与优化、质量控制及临床试验全流程的分析解决方案。在蛋白质结构表征、细胞培养基开发和培养工艺优化、产品质量控制、工艺杂质残留、DMPK 分析等方面积累了丰富的案例，汇编为《岛津生物药整体解决方案（一）—蛋白类药物分析篇》应用文集，供您参考。

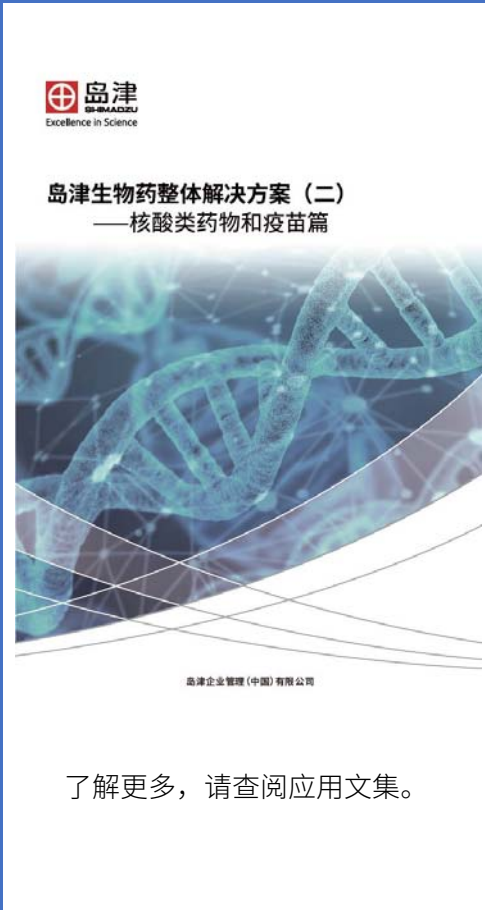
 <p>岛津 SHIMADZU Excellence in Science</p> <p>SGC06-20-09</p> <p>岛津生物药整体解决方案（一） ——蛋白类药物分析篇</p> <p>岛津企业管理(中国)有限公司</p> <p>了解更多，请扫码查阅应用文集。</p> 	<p>精彩掠影：</p> <ul style="list-style-type: none">▪ 蛋白质结构表征<ul style="list-style-type: none">▪ Q-TOF LCMS-9030/LCMS-9050 结合蛋白分析软件可进行整体分子量分析、亚基分子量分析、肽图分析、二硫键分析、糖型确认、全序列分析等；▪ MALDI-TOF 进行 PEG 修饰蛋白的分子量表征；▪ 细胞培养工艺优化/培养基方法开发<ul style="list-style-type: none">▪ LC-MS/MS 结合细胞培养分析方法包（第三版）可一针进样 17 min 内同时分析 144 种化合物，覆盖胞内胞外代谢物，结果可视化；▪ 产品质量控制<ul style="list-style-type: none">▪ 生物惰性液相 Nexera XSi inert 可进行聚集体分析、电荷异质性分析、ADC 药物 DAR 值分析、滴度分析、肽图分析、糖型分析等，可抑制金属吸附、耐酸耐碱耐高盐，稳定性好、耐用性佳；▪ 工艺杂质残留分析<ul style="list-style-type: none">▪ 开发了浸出物和工艺杂质分析方案，如来自一次性培养袋的浸出物 bDtBPP，来自包材的己内酰胺、2-巯基苯并噻唑、全氟辛酸、双酚 A 和氮亚硝胺类化合物，以及来自工艺过程的氢化可的松、甲氨蝶呤等杂质分析方法。▪ DMPK 分析<ul style="list-style-type: none">▪ LC-MS/MS 结合 nSMOL 技术可对抗体药物 Fab 区域选择性酶解，获得靶标蛋白特异性肽段，实现抗体定量。
--	--

一图速览《岛津生物技术药物整体解决方案（一）—蛋白类药物分析篇》



2. 《岛津生物药整体解决方案（二）—核酸类药物和疫苗篇》

核酸药物主要分为寡核苷酸和mRNA两大类。寡核苷酸质量评价通常涉及分子量确认、序列确认、递送介质定量分析、纯度分析、原料纯度分析、解链温度分析等方面。mRNA质量评价通常涉及mRNA结构表征、原料分子量确认、递送介质定量分析、mRNA纯度分析、原料纯度分析、质粒构型分析等方面。岛津始终密切关注核酸药物分析需求，使用多种仪器，开发了一系列寡核苷酸药物、mRNA疫苗和核酸药物递送系统分析方法，《岛津生物药整体解决方案（二）—核酸类药物和疫苗篇》应用文集，供您参考。

 <p>岛津 SHIMADZU Excellence in Science</p> <p>岛津生物药整体解决方案（二） —核酸类药物和疫苗篇</p> <p>岛津企业管理（中国）有限公司</p> <p>了解更多，请查阅应用文集。</p>	<p>精彩掠影：</p> <ul style="list-style-type: none">▪ 结构表征<ul style="list-style-type: none">▪ MALDI-TOF 可进行寡核苷酸分子量和碱基序列确认，以及共转录加帽和酶法加帽反应后 mRNA 的帽子端分析，分析速度快、结果解析简单直观；▪ 原料质控<ul style="list-style-type: none">▪ MALDI-TOF 可进行寡核苷酸原料亚磷酰胺单体、mRNA 体外转录原料以及 mRNA 加帽原料帽子类似物分析，可快速、准确、直观地进行分子量确认；▪ 递送介质分析<ul style="list-style-type: none">▪ 岛津液相色谱结合蒸发光散射检测器 ELSD-LT III 可进行脂质纳米粒（LNP）中四种成分，以及寡核苷酸递送介质聚乙烯亚胺含量测定，方法灵敏度高、线性范围宽、重复性好；▪ 纯度、质粒构型分析<ul style="list-style-type: none">▪ 生物惰性液相 Nexera XS inert 可抑制磷酸基团的金属吸附、耐酸耐碱耐高盐，尤其适合核酸药物及其原料纯度分析、质粒的三种构型（超螺旋、线性 and 开环）相对含量分析，方法残留小、重复性好、准确可靠。▪ 解链温度 Tm 分析<ul style="list-style-type: none">▪ 紫外可见分光光度计搭配 Tm 分析系统可进行双链结构核酸药物解链温度分析，Tm 分析软件可直观读出解链温度。
---	--



Q-TOF LCMS-9030/LCMS-9050

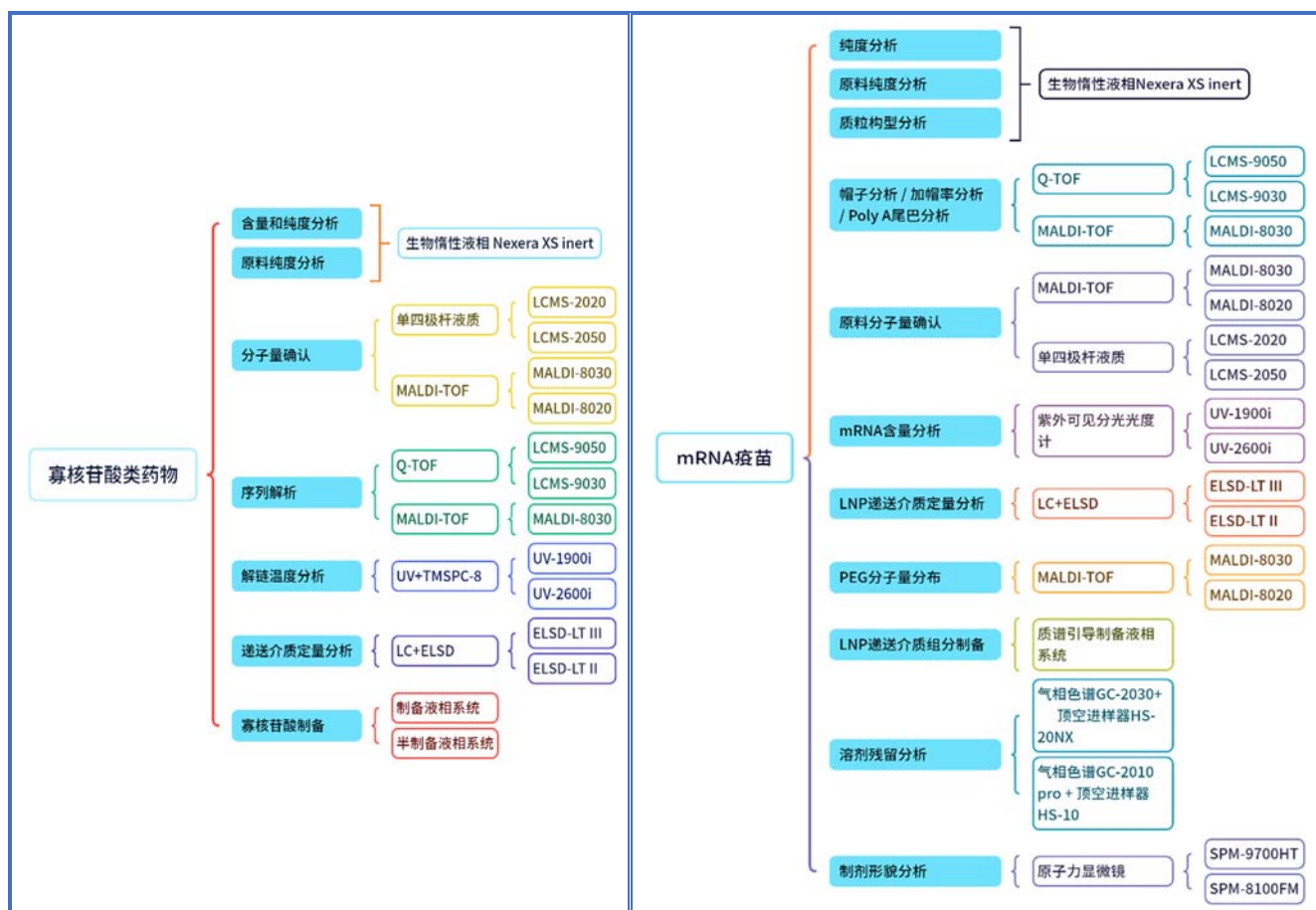


MALDI- 8020/8030



LC-40+ELSD-LT III

一图速览《岛津生物技术药物整体解决方案（二）——核酸类药物和疫苗篇》



3. 《岛津生物药整体解决方案（三）——细胞培养上清液和培养基分析篇》

现代生物技术一般包括基因工程、细胞工程、酶工程和发酵工程技术，细胞培养是其重要环节。开发合适的培养基配方和优化培养条件是保证产品产量、质量及批间一致性的关键因素。为了满足日益增长的细胞培养基、细胞培养上清液和细胞内代谢物组分的全面、快速、同时分析需求，岛津开发了“细胞培养分析方法包”。该技术采用超快速三重四极杆液质联用仪，可在 20 分钟内同时对最多 144 种化合物进行快速分析。测定目标物涵盖糖、氨基酸、维生素、核酸及细胞胞内胞外代谢物。搭配 Muti-omics 多组学分析软件可实现分析结果可视化，可直观展示组分含量随时间的变化趋势，以及胞内和胞外代谢物在代谢通路图中的位置及其含量变化趋势，帮助分析者更好的决策。基于该技术平台，岛津在细胞培养基和培养工艺优化方面，已积累了丰富的应用案例，现汇编为《岛津生物药整体解决方案（三）——细胞培养上清液和培养基分析篇》，供您参考。

LC/MS/MS Method Package for Cell Culture Profiling Ver. 3 for LabSolutions LCMS



第三代细胞培养用分析方法包

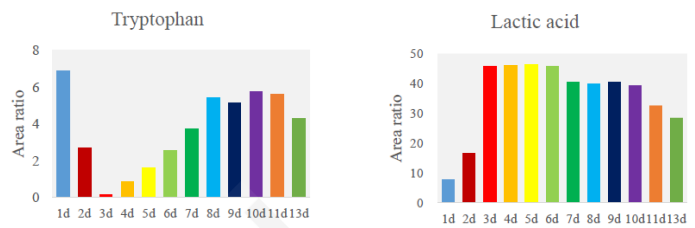


超快速三重四极杆液质联用仪



精彩掠影：

- **细胞培养基分析**
 - 应用于含血清和无血清培养基成分差异分析，帮助开发更符合要求、营养丰富的无血清培养基；
 - 应用于三种抗体药物生产用培养基组成和相对含量的差异分析，可用于不同类别、不同批次培养基的一致性评估。
- **细胞培养过程监控**
 - 应用于抗体药物生产的 CHO 细胞株、哺乳动物细胞、藤黄杆菌、链霉菌、酵母菌和真菌等培养过程监控，可以直观显示培养过程中上清液组分含量变化趋势，从而为培养工艺的改进提供直接的参考依据。



示例：哺乳动物细胞 1-13 天培养过程中化合物相对含量变化情况

4. 《岛津生物药整体解决方案（四）—生物药杂质和辅料分析篇》

生物药杂质可能来源于生产过程中可能产生的聚集体，或工艺中所用到的试剂残留，也可能来自于细胞培养材料或包装材料中的浸出物污染。生物药辅料如吐温 80，可以防止蛋白质在溶解过程中变性、聚集、表面吸附和絮凝，但其降解产物可能会对人体产生副作用。故对生物药杂质和辅料建立可靠的分析方法，对其含量或纯度进行分析和评估，对产品的安全性和有效性至关重要。岛津在生物药杂质和辅料分析方面，已积累了丰富的应用案例，现汇编为《岛津生物药整体解决方案（四）—生物药杂质和辅料分析篇》，供您参考。



动态颗粒图像分析系统 iSpect DIA-10



生物惰性液相色谱 Nexera XS inert



电感耦合等离子体质谱仪 ICPMS-2030

岛津生物药整体解决方案（四）
——生物药杂质和辅料分析篇



岛津企业管理(中国)有限公司

了解更多，请查阅应用文集。

精彩掠影：

- **浸出物和工艺杂质分析**
 - LC-MS/MS 分析一次性细胞培养袋浸出物抗氧化剂双(2,4-二叔丁基苯基)磷酸酯 (bDtBPP)，该物质过量将抑制细胞生长，本方法快速、灵敏、可靠，可用于含量监控。
 - ICPE-9820 测定单抗药物中消泡剂残留量，方法简便、快速、准确，适用于蛋白类药物中消泡剂残留量测定。
- **聚集体和不溶性微粒分析**
 - 生物兼容液相 Nexera Bio 分析贝伐单抗、阿达木单抗和 Fc 融合蛋白多聚体，分离度好、重复性佳。
 - 使用动态颗粒图像分析系统 iSpect DIA-10 分析了单抗药物中不溶性颗粒的粒度、粒形和颗粒圆度，发现该药物中存在少量粒径较大且形状不规则的颗粒。
- **药用辅料分析**
 - 使用 MALDI-TOF 分析了药用辅料聚乙二醇的分子量及分布；通过比较标品和吐温 80 的分子量分布，对注射剂辅料吐温 80 降解程度进行了评价。
 - 使用 LC-MS/MS 分析了重组人白介素中助溶剂十二烷基硫酸钠 (SDS) 含量，方法线性范围宽、灵敏度高、重复性好，适合用于 SDS 含量监控。

二、寡核苷酸药物分析

寡核苷酸药物主要通过亚磷酰胺固相合成法进行生产，在工艺过程中会产生一系列杂质，如截短序列（N-1、N-2 等）、增长序列（N+1、N+2 等）、酸碱处理以及储存导致的降解产物等。为保证药物质量，需要对经过分离纯化后的寡核苷酸药物进行纯度、分子量和序列确认、杂质定性和定量等分析。

寡核苷酸药物分子量较大，约 7~15 KDa，是电负性、强极性化合物。使用常规反相色谱进行分析，保留较弱，故通常采用离子对反相色谱法（IP-RP-HPLC）或阴离子交换色谱法（AEX-HPLC）进行纯度和杂质分析。离子对反相色谱法通过寡核苷酸疏水性差异进行分离，流动相中添加的挥发性离子对试剂可与质谱兼容。阴离子交换色谱法通过电荷差异进行分离，流动相中常用到 NaClO_4 、 NaCl 等不挥发性盐，与质谱不兼容。由于寡核苷酸药物富含磷酸基团，容易与金属表面产生非特异性吸附，造成峰形拖尾、低浓度不出峰，校准曲线不成线性等一系列棘手的分析问题。岛津生物惰性液相系统 Nexera XS inert 在与样品接触的部位采用非金属材料设计，可以很好地抑制寡核苷酸药物的金属吸附，获得良好的峰形和出色的稳定性。此外，输液泵等部位采用耐腐蚀合金设计，更耐高盐流动相的腐蚀。即抗金属吸附又耐高盐腐蚀的 Nexera XS inert 是进行寡核苷酸药物分析的理想仪器。

寡核苷酸药物的分子量和碱基序列是其关键质量属性，通常可使用 MALDI-TOF 或 IP-RP-LCMS 进行测定。MALDI-TOF 无需使用含离子对试剂的流动相、无需担心质谱污染、前处理简单、几秒到几十秒内即可得到质谱图、质谱主要以单电荷离子为主、解谱简单，可以快速、高通量测定寡核苷酸分子量和碱基序列。离子对反相色谱结合单四极杆液质联用仪（LCMS）、三重四极杆液质联用仪（LC-MS/MS）或四极杆飞行时间质谱仪（Q-TOF），再辅以多电荷解卷积软件，可以测定寡核苷酸分子量。离子对反相色谱结合 Q-TOF，再通过碱基序列确认软件，可以进行寡核苷酸序列确认。

双链结构寡核苷酸药物随着温度升高，双链结构逐渐打开，最终转变为单链结构。将双链和单链所占比例相等的温度定义为解链温度（ T_m ）。 T_m 是衡量双链结构核酸类物质稳定性的重要指标，是控制结构和功能的关键因素。核酸类物质在 260 nm 附近有紫外吸收峰，吸收值在解链过程中增加，通过测试吸光度的变化，可以确定 T_m 值。通过紫外分光光度计测定双链类寡核苷酸药物 T_m 值是经典方法。

本章介绍了岛津生物惰性液相 Nexera XS inert 分析寡核苷酸药物纯度和杂质，MADI-TOF、LCMS 和 Q-TOF 测定寡核苷酸分子量，MADI-TOF 和 Q-TOF 进行寡核苷酸序列确认， T_m 分析系统测定寡核苷酸 T_m ，寡核苷酸原料分析等应用案例，供您参考。

LCMS 测定反义寡核苷酸分子量

摘要： 本文使用生物惰性超高效液相色谱四极杆质谱联用仪 LCMS-2050 测定反义寡核苷酸分子量。采用 DUIS (ESI+APCI) 负离子模式对待测样品进行质谱扫描，使用 LabSolutions 软件对质谱图进行多电荷分析。结果表明，质谱图中含 5 种多电荷离子，电荷数量为 4~8。通过多电荷解卷积分析计算得到该反义寡核苷酸样品分子量为 6681.57 Da，与理论值的偏差为 0.4 Da，质量准确度高。LCMS-2050 具有质量范围宽的特点，适合分子量较大的反义寡核苷酸分子量检测。

关键词： 单四极杆质谱 反义寡核苷酸 分子量 质谱多电荷分析

技术特点：

- ❖ 使用岛津最新单四极杆质谱仪，其采用 ESI/APCI (DUIS) 加热型离子源，灵敏度高。
- ❖ 反义寡核苷酸在 LCMS-2050 上形成数个多电荷，通过 LabSolutions 软件中“质谱多电荷分析”功能可准确测定其分子量。

小核酸药物是长度较短、碱基少于30nt的一类核酸药物，其通过作用于致病靶基因或者靶mRNA，从根源上调控致病基因的表达，达到疾病治疗的目的。小核酸药物主要有反义寡核苷酸（antisense oligonucleotide, ASO）、小干扰RNA（small interference RNA, siRNA）、微小RNA（micro RNA, miRNA）、RNA适配体（RNA aptamer）、抗体核酸偶联药物（antibody-siRNA conjugate ARC）等。

其中，ASO药物实质上是单链DNA，或者DNA与RNA杂合链，分子量的测定是其质量控制中非常重要的步骤之一。本文采用LCMS-2050采集得到ASO质谱图，并结合岛津LabSolutions软件的“质谱多电荷分析”功能对质谱图进行解卷积分析，可以准确测定ASO分子量。LCMS-2050具有质量范围宽的特点，适合分子量较大的ASO分子量测定。

1. 实验部分

1.1 仪器

生物惰性液相色谱仪 Nexera XS Inert 与单四极杆质谱仪 LCMS-2050 联用系统，具体配置信息如下：

系统控制器	： CBM-40	自动进样器	： SIL-40C XSi
脱气机	： DGU-405	柱温箱	： CTO-40C
输液泵	： LC-40D XSi×2	质谱仪	： LCMS-2050 单四极杆质谱仪
色谱工作站	： LabSolutions Ver. 5.114		



图 1. 高效液相色谱质谱联用仪 LCMS-2050

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 相-10mM DIPEA+100mM HFIP,
B 相-乙腈 进样体积 : 5 µL

流 速 : 0.3 mL/min 柱 温 : 55°C

洗脱方式 : 梯度洗脱, B 相初始浓度为 5%, 时间程序见表 1。

表 1. 梯度洗脱程序

Time(min)	Module	Command	Value
1.00	Pumps	Pump B Conc.	5
6.00	Pumps	Pump B Conc.	30
6.10	Pumps	Pump B Conc.	95
7.00	Pumps	Pump B Conc.	95
7.10	Pumps	Pump B Conc.	5
12.00	Control	Stop	

质谱条件

离 子 源 : DUIS (ESI+APCI) 脱 溶 剂 温 度 : 450°C

雾 化 气 : 2.0 L/min 接 口 电 压 : -2 kV

干 燥 气 : 5.0 L/min 扫 描 模 式 : Scan (-)

加 热 气 : 7.0 L/min 扫 描 范 围 : 50~2000

D L 温 度 : 250°C

1.3 样品前处理方法

将反义寡核苷酸样品用水溶解, 并稀释至 50 µg/mL。

2. 结果与讨论

2.1 反义寡核苷酸样品色谱图与质谱图

该反义寡核苷酸为单链 DNA，其总离子流图如图 2 所示，质谱图如图 3 所示。从质谱图得知，样品中不同电荷数的离子质谱信号明显。

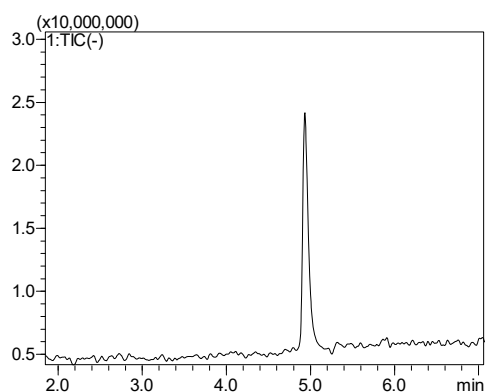


图 2. 反义寡核苷酸总离子流图

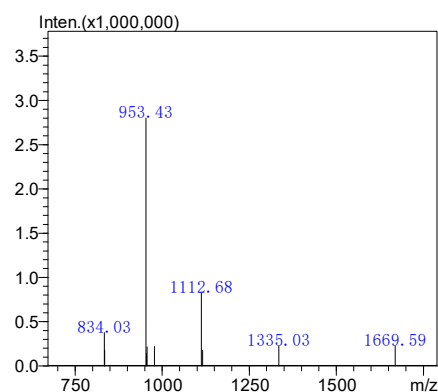


图 3. 反义寡核苷酸质谱图

2.2 质谱多电荷分析结果

通过岛津 LabSolutions™ 软件的解卷积“质谱多电荷分析”功能对样品质谱图进行分析，首先在方法视图编辑多电荷分析参数，然后在定性处理中点击质谱多电荷分析，即可得到分析结果，具体操作步骤如图 4 所示。多电荷分析结果如图 5 所示，从结果得知，该反义寡核苷酸质谱图含 5 个不同电荷数离子峰，电荷数量为 4~8，软件解卷积计算得到分子量为 6681.57 Da，各多电荷峰的质量数标准偏差为 0.436 Da。

该反义寡核苷酸样品序列为 G*C*G*T*T*T*G*C*T*C*T*T*C*T*T*C*T*T*G*C*G, 理论分子量为 6681.57 Da，计算分子量与理论分子量偏差为 0.4 Da，计算结果准确度高。

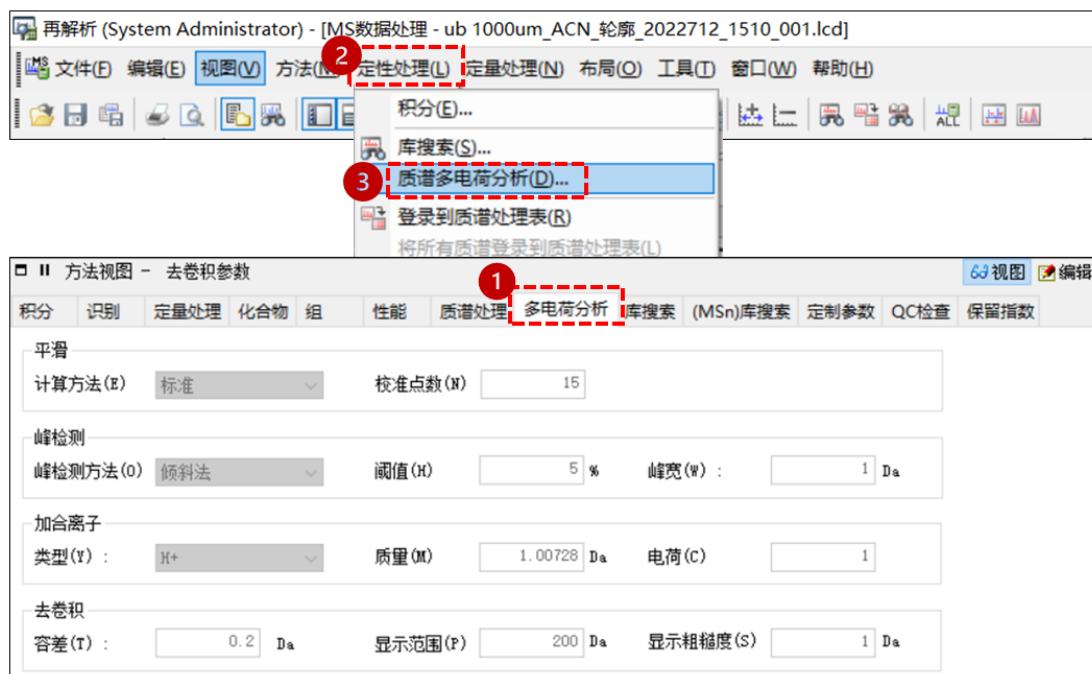


图 4. 岛津 LabSolutions™ 的解卷积功能设置

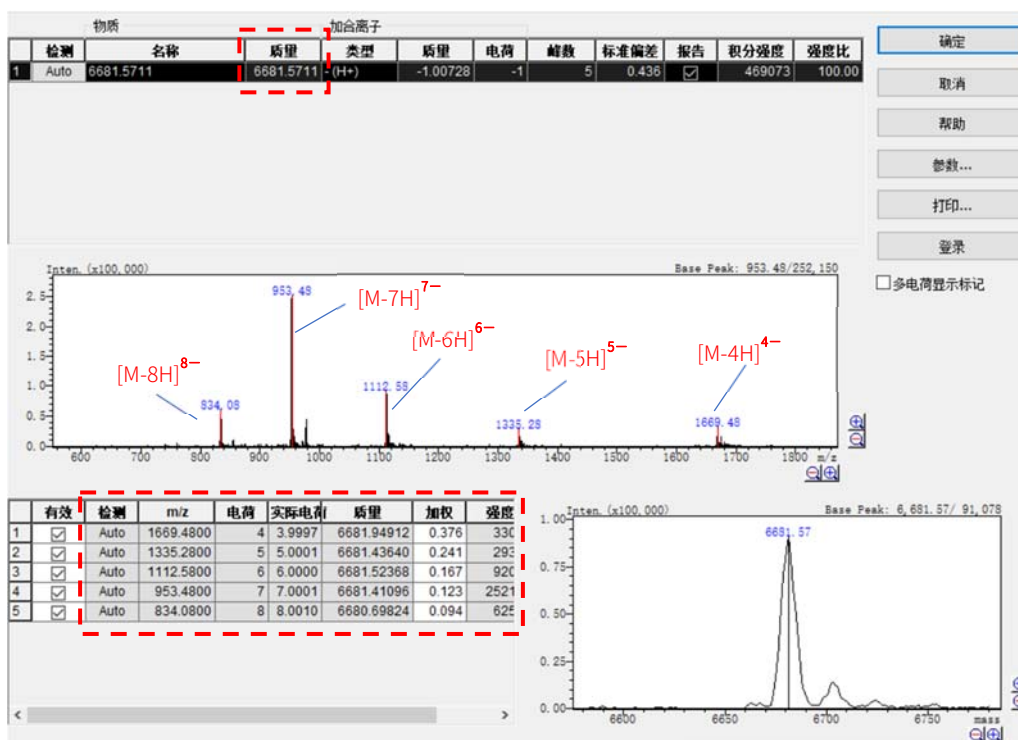


图 5. 反义寡核苷酸分子量解卷积结果

表 2. 理论分子量与实测分子量比较

样品名	序列	理论分子量 (Da)	实测分子量 (Da)	偏差 (Da)
反义寡核苷酸	G*C*G*T*T*T*G*C*T*C*T*T*C*T *T*C*T*T*G*C*G	6681.17	6681.57	0.4

3. 结论

本文使用生物惰性超高效液相色谱四极杆质谱联用仪 LCMS-2050 测定反义寡核苷酸分子量。采用 DUIS (ESI+APCI) 负离子模式对待测样品进行质谱扫描, 使用 LabSolutions 软件的“质谱多电荷分析”功能对质谱图进行解卷积分析。结果显示, 质谱图中含 5 种多电荷离子, 电荷数量为 4~8。通过解卷积分析确认了该反义寡核苷酸样品分子量为 6681.57 Da, 与理论分子量的偏差为 0.4 Da, 质量准确度高。LCMS-2050 具有质量范围宽的特点, 适合分子量较大的反义寡核苷酸分子量检测。

LCMS 测定小干扰核苷酸 siRNA 分子量

摘要：本文使用生物惰性超高效液相色谱仪 Nexera XS inert 与 LCMS-2050 联用，测定了小干扰核苷酸 siRNA 分子量。采用 DUIS (ESI+APCI) 离子源的负离子模式分析待测样品，通过优化流动相和质谱采集参数，去除干扰质谱峰，使用 LabSolutions 软件自带的“质谱多电荷分析”功能准确测定 siRNA 分子量。结果显示，siRNA 正义链质谱图中含 8 种多电荷离子，电荷数量分布为 4~11，多电荷分析测定分子量为 6631.63 Da，与理论值的偏差为 0.34 Da。siRNA 反义链质谱图中含 7 种多电荷离子，电荷数量为 4~10，多电荷分析测定分子量为 6637.64 Da，与理论值的偏差为 0.39 Da，质量准确度高。LCMS-2050 具有质量范围宽的特点，结合 LabSolutions 软件自带的“质谱多电荷分析”功能，可以用于测定 siRNA 分子量。

关键词：单四极杆质谱 siRNA 分子量 质谱多电荷分析

技术特点：

- ❖ 在流动相中添加微量 EDTA，络合系统中 Na⁺，排除了加钠峰对分子量的干扰。
- ❖ 调整 MS 参数中 Qarray 电压，可充分去除六氟异丙醇加和离子。

小核酸药物是长度较短、碱基少于 30 nt 的一类核酸药物，其通过作用于致病靶基因或者靶 mRNA，从根源上调控致病基因的表达，达到疾病治疗的目的。小核酸药物主要有反义寡核苷酸 (antisense oligonucleotide, ASO)、小干扰 RNA (small interference RNA, siRNA)、微小 RNA (micro RNA, miRNA)、RNA 适配体 (RNA aptamer)、抗体核酸偶联药物 (antibody-siRNA conjugate ARC) 等。

其中，siRNA 为双链 RNA，分子量的测定是其质量控制中非常重要的步骤之一。本文采用 LCMS-2050 采集得到 siRNA 质谱图，并结合岛津 LabSolutions 软件的“质谱多电荷分析”功能对质谱图进行解卷积分析，可以准确测定 siRNA 分子量。LCMS-2050 具有质量范围宽的特点，适合分子量较大的 siRNA 分子量测定。

1. 实验部分

1.1 仪器

生物惰性超高效液相色谱四极杆质谱联用仪 LCMS-2050，具体配置信息如下：

系统控制器	: CBM-40	脱气机	: DGU-405
输液泵	: LC-40D XSi×2	自动进样器	: SIL-40C XSi
柱温箱	: CTO-40C	质谱仪	: LCMS-2050 单四极杆质谱仪
色谱工作站	: LabSolutions Ver. 5.114		



图 1. 高效液相色谱质谱联用仪 LCMS-2050

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 相-10mM DIPEA+25mM HFIP+10μM EDTA, B 相-乙腈

进 样 体 积 : 10 μL 流 速 : 0.3 mL/min

柱 温 : 55°C

洗 脱 方 式 : 梯度洗脱, B 相初始浓度为 5%, 时间程序见表 1。

表 1. 梯度洗脱程序

Time(min)	Module	Command	Value
1.00	Pumps	Pump B Conc.	5
2.00	Pumps	Pump B Conc.	6
10.00	Pumps	Pump B Conc.	8
10.10	Pumps	Pump B Conc.	95
12.00	Pumps	Pump B Conc.	95
12.10	Pumps	Pump B Conc.	5
16.00	Control	Stop	

质谱条件

离 子 源 : DUIS (ESI+APCI) 脱 溶 剂 温 度 : 450°C

雾 化 气 : 2.0 L/min 接 口 电 压 : -2 kV

干 燥 气 : 5.0 L/min Q array 电 压 : -50 V

加 热 气 : 7.0 L/min 扫 描 模 式 : SCAN (-)

D L 温 度 : 250°C 扫 描 范 围 : 50~2000

1.3 样品前处理方法

将 siRNA 样品用水溶解, 并稀释至 50 μg/mL。

2. 结果与讨论

2.1 方法优化

该 siRNA 样品为双链 RNA，分别为正义链和反义链。在色谱条件下分离为两个峰，其总离子流图如图 2 所示，质谱图如图 3 所示。从质谱图可以看出，质谱峰非常杂乱，这对 siRNA 分子量的确定造成了严重的干扰，所以需优化方法，去除干扰质谱峰。

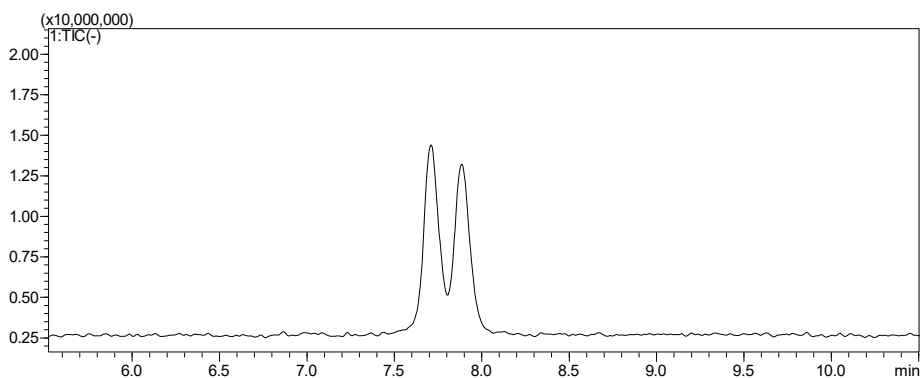


图 2. siRNA 总离子流图

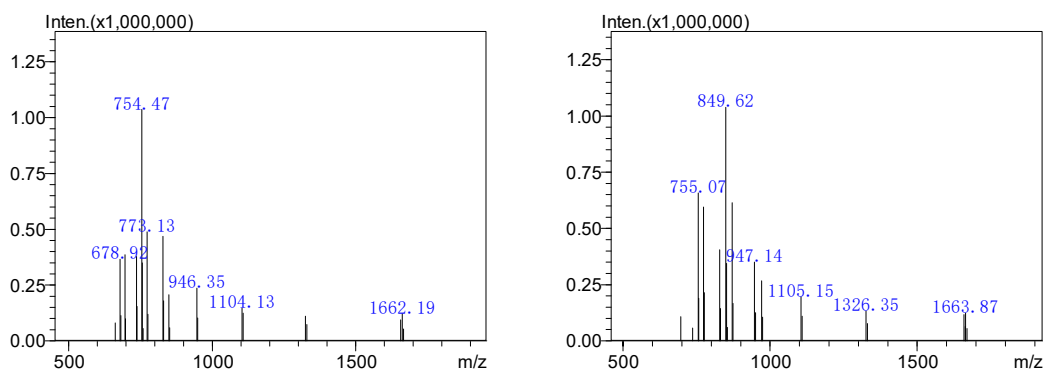
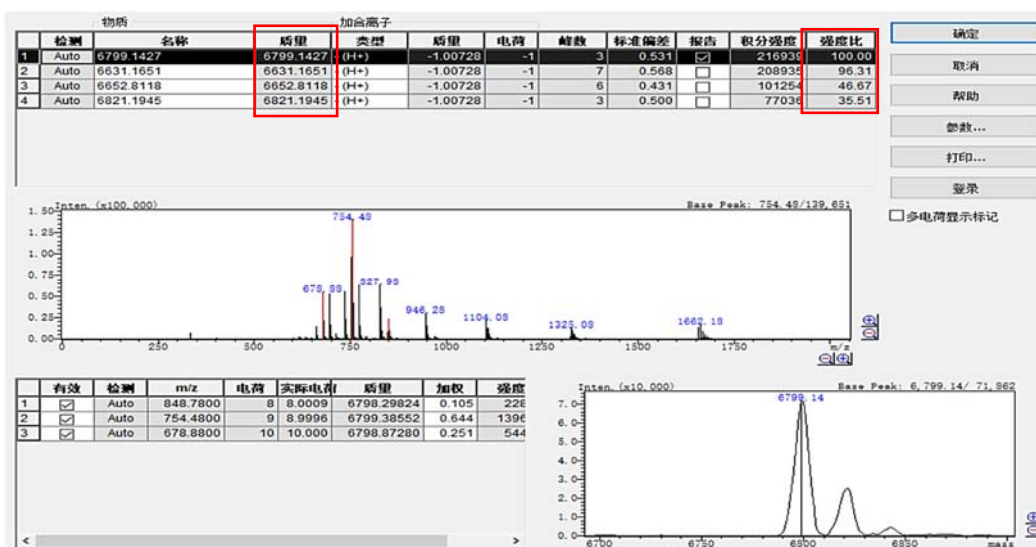


图 3. siRNA 质谱图 (左图: 正义链; 右图: 反义链)

以下以正义链为例，描述方法优化过程。通过岛津 LabSolutions™ 软件“质谱多电荷分析”功能对质谱图进行解卷积分析，分析结果如图 4 所示。质谱图解卷积后得到 4 个分子量，分别为 6799.1、6631.1、6652.8、6821.2Da，其比例分别为 100: 96: 46: 35。其中 6631.1 为 siRNA 正义链分子量，6799.1 与 6631.1 相差 168.0，推测其为正义链加和流动相中六氟异丙醇 (HFIP，分子量为 169) 加和后得到的分子量。6652.8 与 6631.1 相差 21.7，推测其为正义链加和系统中钠离子。6821.2 与 6631.1 相差 190.1，推测为正义链加和 HFIP 和 Na 后得到的分子量。



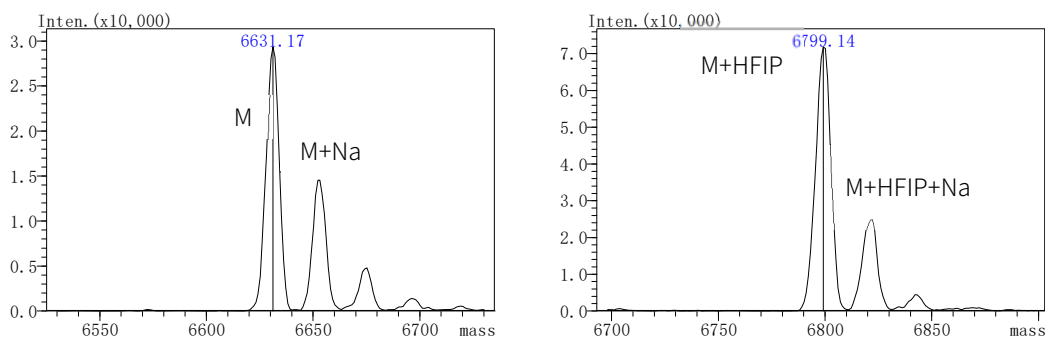


图 4. siRNA 分子量解卷积结果

为了去除质谱图中的加和离子，首先在流动相中添加 10 μM EDTA，用于络合系统中 Na^+ ，去除 M+Na 峰。多电荷解卷积结果如图 5 所示，结果显示 siRNA 已无明显加钠峰。

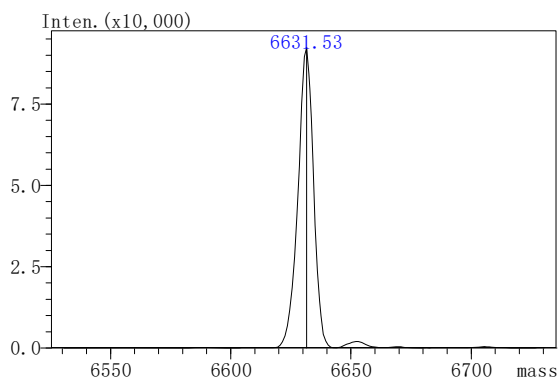
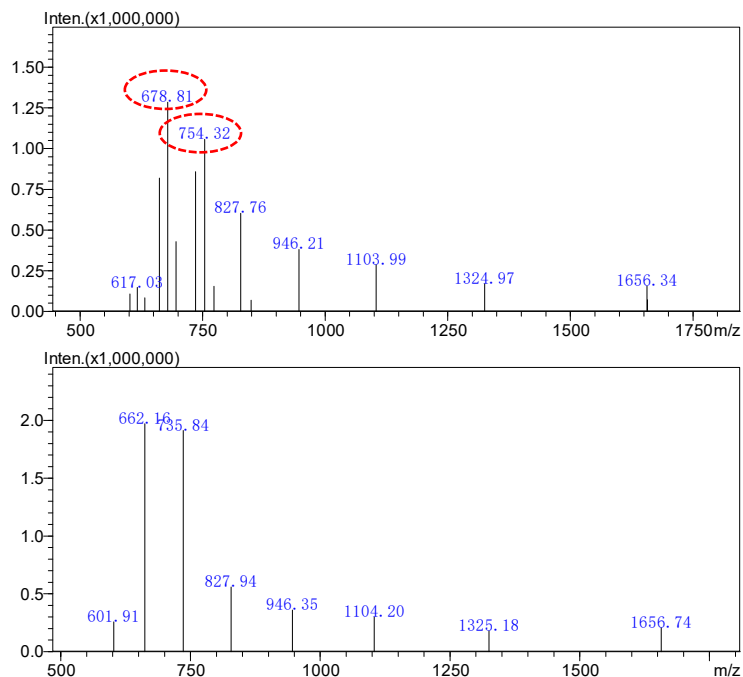


图 5. 流动相加入 EDTA 后 siRNA 分子量解卷积结果

为了去除 HFIP 加和峰，本实验对 Qarray 电压进行调整。将 Qarray 电压分别设置为 -20、-50、-80 V，得到的质谱图如图 6 所示。从图可知，当 Qarray 电压为 -20 V 时，质谱图中还是有 678.81、754.31 等正义链加和 HFIP 后的多电荷峰。当 Qarray 电压为 -50 V 时，去除了正义链加和 HFIP 的多电荷峰，质谱图变得非常干净。当进一步加大 Qarray 电压至 -80 V 时，带电荷较多的质谱峰响应明显下降，且产生了新的碎裂。所以最终确定 Qarray 电压为 -50 V。



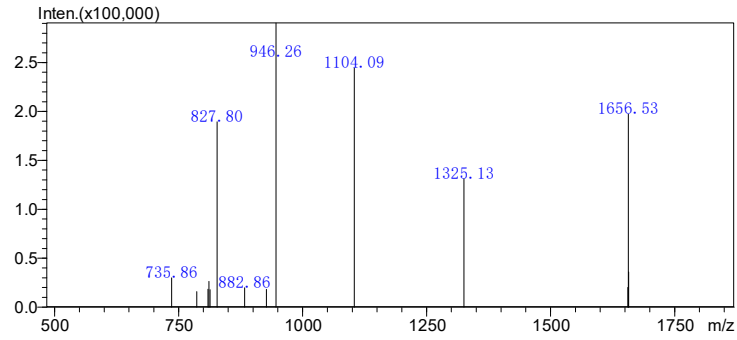
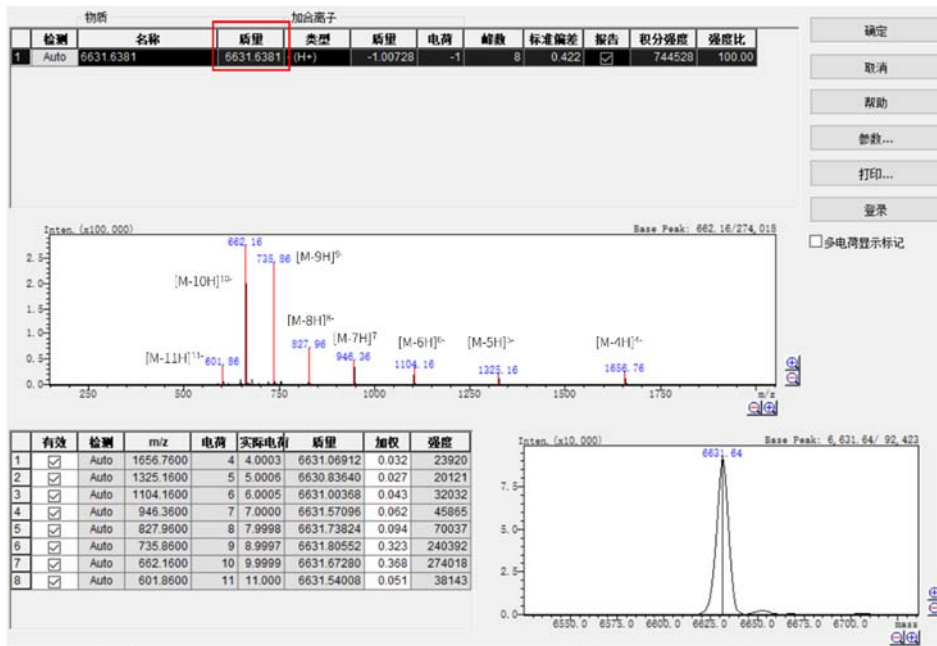


图 6. 不同 Qarray 电压得到的 siRNA 质谱图 (上: -20V, 中: -50V, 下: -80V)

2.2 质谱多电荷分析结果

对优化后得到的质谱图进行多电荷解卷积分析, 分析结果如图 7 所示。从结果得知, 该 siRNA 正义链质谱图含 8 个不同电荷数离子峰, 电荷数量为 4~11, 软件解卷积计算得到分子量为 6631.63 Da, 各多电荷峰的质量数标准偏差为 0.422 Da。siRNA 反义链质谱图含 7 个不同电荷数离子峰, 电荷数量为 4~10, 软件解卷积计算得到分子量为 6637.64 Da, 各多电荷峰的质量数标准偏差为 0.569 Da。



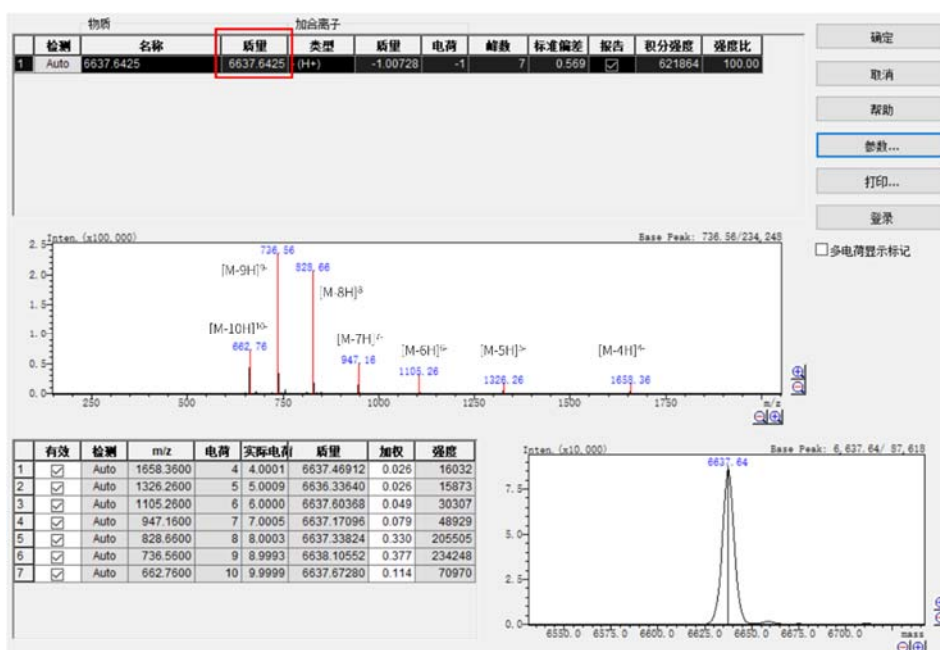


图 7. siRNA 正义链与反义链分子量解卷积结果

该 siRNA 正义链和反义链序列如表 2 所示，理论分子量分别为 6631.97 和 6638.03Da，实测分子量与理论分子量的偏差分别为 0.34 和 0.39 Da。

表 2. 理论分子量与实测分子量比较

样品名	序列	理论分子量 (Da)	实测分子量 (Da)	偏差 (Da)
siRNA 正义链	AUGGAAUACUCUUGGUUACdTdT	6631.97	6631.63	0.34
siRNA 反义链	GUAACCAAGAGUAUCCAUDdTdT	6638.03	6637.64	0.39

3. 结论

本文使用生物惰性超高效液相色谱仪 Nexera XS inert 与 LCMS-2050 连用，测定了小干扰核苷酸 siRNA 分子量。通过方法优化，去除了质谱图中干扰离子峰，结合 LabSolutions 软件质谱多电荷分析功能准确测得了 siRNA 分子量。

MALDI-8020 快速检测寡核苷酸药物的分子量及杂质

摘要：本文应用岛津台式基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱 MALDI-8020 对 mRNA 和 DNA 生产所用的 NTP 和 dNTP 原料进行质谱分析，可直接检测到核苷酸原料的分子量及组成形式。本方法操作简便、分析速度快，结果直接可靠，为 mRNA 和 DNA 生产相关原料的质量控制提供了参考。

关键词： MALDI-TOF mRNA DNA 原料 NTP dNTP

技术特点：

- ❖ 一次实验可直接检测到核苷酸原料的分子量及组成形式。
- ❖ 本方法无需复杂的样品前处理，操作简便，分析速度快，可以进行高通量检测。

mRNA和DNA生产过程中需要用到多种核苷酸类原料。例如，mRNA生产时，体外转录的直接原料为NTP（ATP、UTP、CTP、GTP），DNA聚合酶生产DNA时的直接原料为dNTP（dATP、dTTP、dCTP、dGTP）。核苷酸原料的检测与分析是mRNA和DNA生产物料质控的重要一环。

本文应用台式MALDI-TOF质谱仪MALDI-8020对NTP、dNTP原料进行了分析，直接检测到了原料的分子量及分子组成形式。该检测方法无需复杂的样品前处理、操作简单、分析速度快，检测通量高，结果直接可靠，可作为核酸原料质控的日常检测手段。

1. 实验部分

1.1 仪器

台式基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱仪 MALDI-8020

1.2 分析条件

调谐模式	： 线性正离子模式	激光能量	： 75-80
激光器	： 355 nm 固态激光器	离子门阈值	： 300
扫描范围	： m/z 300-2000	脉冲引出质量(Da)	： 1500

1.3 样品前处理

取样品加水稀释为100 μM，作为样品工作液。吸取0.5 μL NaTFA溶液（1 mg/mL）、1.1 μL DHB基质溶液（30 mg/mL）、0.5 μL 样品工作液依次点靶，自然干燥后将靶板送入质谱分析。

2. 结果与讨论

2.1 mRNA 体外转录原料 NTP 分子量及组成分析

应用 MALDI-8020 对 mRNA 体外转录原料 ATP、GTP、CTP、UTP 进行检测，结果见图 2，核苷酸的分子式、理论分子量、实测分子量见表 1。以图 2A 为例，ATP 检测到 m/z 530.12、m/z 552.16、m/z 574.13、m/z 596.11 的离子峰，依次对应 ATP 的 $[M+Na]^+$ 、 $[M+2Na-H]^+$ 、 $[M+3Na-2H]^+$ 以及 $[M+4Na-3H]^+$ 的化合物形式^[1,2]，可能为 ATP 中三磷酸基团上 H 离子被 Na 离子部分或全部取代后的产物。同样地，GTP、CTP、UTP

也依次检测到了结合 1-4 个 Na 离子的化合物离子形式，结果见表 1 及图 2。除核苷酸目标峰外，样品还检测到基质背景峰，如 m/z 551。

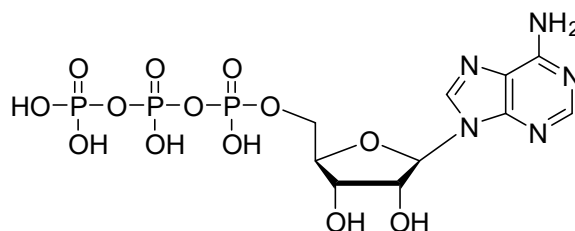


图 1. ATP（三磷酸腺苷）结构式（核苷酸结构式示例）

表1. NTP分子式及分子量检测结果

名称	分子式	$[M+Na]^+_{mono}$		$[M+2Na-H]^+_{mono}$		$[M+3Na-2H]^+_{mono}$		$[M+4Na-3H]^+_{mono}$	
		理论值	实测值	理论值	实测值	理论值	实测值	理论值	实测值
ATP	$C_{10}H_{16}N_5O_{13}P_3$	529.99	530.12	551.97	552.16	573.95	574.13	595.93	596.11
GTP	$C_{10}H_{16}N_5O_{14}P_3$	545.98	546.15	567.96	568.10	589.94	590.08	611.93	612.05
CTP	$C_9H_{16}N_3O_{14}P_3$	505.97	506.12	527.96	527.94	549.94	549.83	571.92	571.88
UTP	$C_9H_{15}N_2O_{15}P_3$	506.96	507.02	528.94	528.85	550.92	550.93	572.90	--

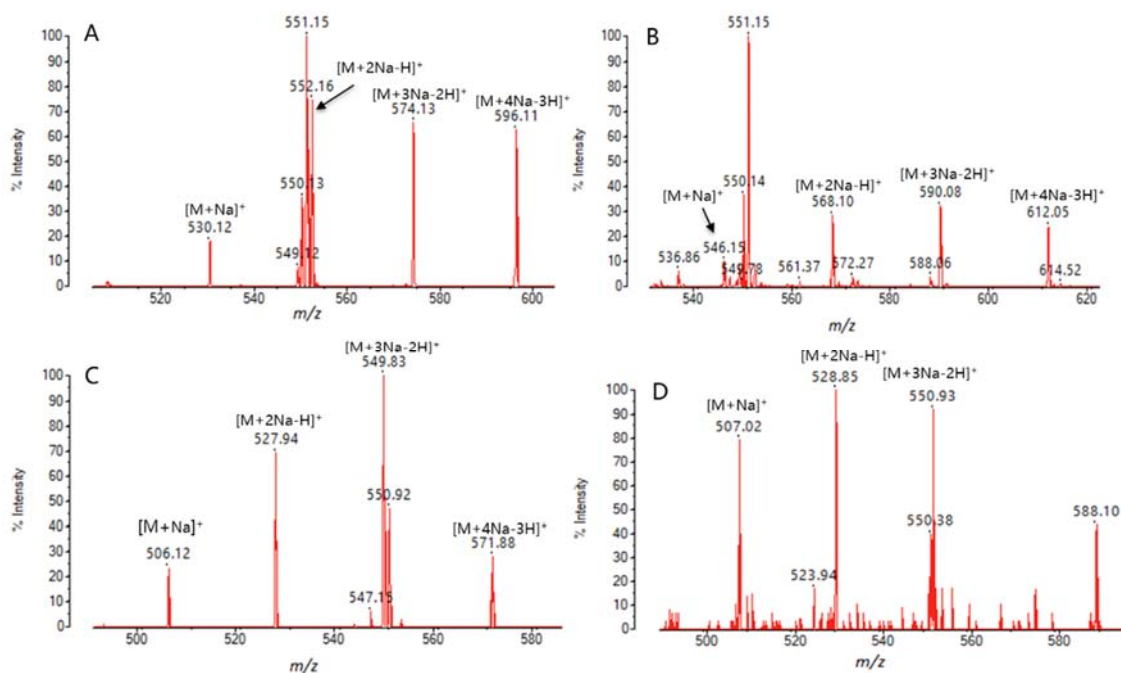


图 2. RNA 药物生产原料 NTP 一级质谱图 (A: ATP, B: GTP, C: CTP, D: UTP)

注： m/z 551 为基质背景峰

2.2 聚合酶链式反应生产 DNA 药物原料 dNTP 分子量及分析

应用 MALDI-8020 对聚合酶链式反应生产 DNA 药物原料 dATP、dGTP、dCTP、dTTP 进行检测，结果见图 3。如图 3A 所示，dATP 检测到 m/z 514.16、 m/z 536.04、 m/z 558.03、 m/z 579.99 的离子峰，依次对应 dATP 的 $[M+Na]^+$ 、 $[M+2Na-H]^+$ 、 $[M+3Na-2H]^+$ 以及 $[M+4Na-3H]^+$ 的化合物形式，可能为 dATP 中三磷酸基团上 H 离子被 Na 离子部分或全部取代后的产物。同样地，dGTP、dCTP、dTTP 也依次检测到了结合 1-4 个 Na 离子的化合物离子形式，结果见表 2 及图 3。

表2. dNTP分子式及分子量检测结果

名称	分子式	$[M+Na]^+_{mono}$		$[M+2Na-H]^+_{mono}$		$[M+3Na-2H]^+_{mono}$		$[M+4Na-3H]^+_{mono}$	
		理论值	实测值	理论值	实测值	理论值	实测值	理论值	实测值
dATP	$C_{10}H_{16}N_5O_{12}P_3$	513.99	514.16	535.97	536.04	557.95	558.03	579.94	579.99
dGTP	$C_{10}H_{16}N_5O_{13}P_3$	529.99	530.08	551.97	552.09	573.95	574.04	595.93	596.04
dCTP	$C_9H_{16}N_3O_{13}P_3$	489.98	489.98	511.96	511.98	533.94	533.90	555.93	555.95
dTTP	$C_{10}H_{17}N_2O_{14}P_3$	504.98	505.23	526.96	526.98	548.94	548.91	570.92	570.95

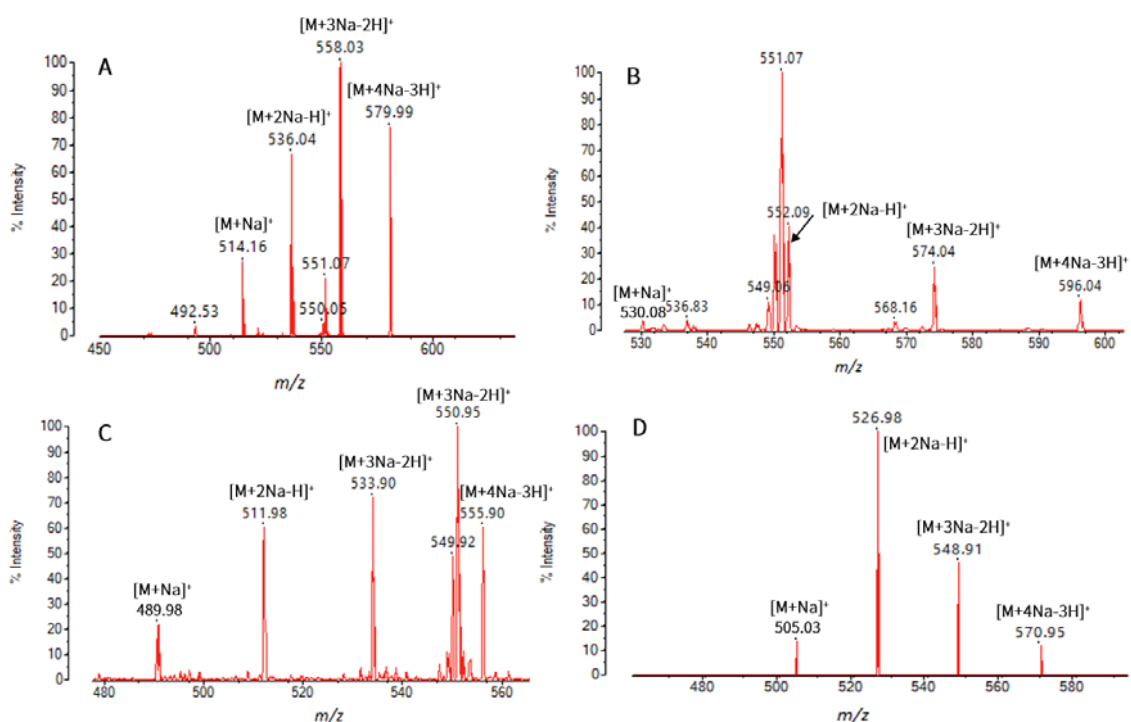


图 3. DNA 药物生产原料 dNTP 一级质谱图(A: dATP, B: dGTP, C: dCTP, D: dTTP)

注: m/z 551 为基质背景峰

3. 结论

本文应用台式基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱 MALDI-8020 对 mRNA 体外转录原料 NTP 以及 DNA 原料 dNTP 进行了分析, 所有原料均检测到了显著的加钠峰, 可以对结果进行快速确证。本方法操作简单、检测成本低、分析速度快, 结果直接、准确、可靠, 有望在 mRNA 体外转录原料和 DNA 原料质控方面有更加广泛的应用。

[参考文献]

1. Eric Largy, Alexander König, Anirban Ghosh, Debasmita Ghosh, Sanae Benabou, Frédéric Rosu, and Valérie Gabelica. Mass Spectrometry of Nucleic Acid Noncovalent Complexes. Chemical Reviews. 2022, 122, 7720-7839
2. Noah P. Christian, Steven M. Colby, Lori Giver, Chris T. Houston, Randy J. Arnold, Andrew D. Ellington and James P. Reilly. High Resolution Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-flight Analysis of Single-stranded DNA of 27 to 68 Nucleotides in Length. RAPID COMMUNICATIONS IN MASS SPECTROMETRY, 1995, VOL. 9, 1061-1066

MALDI-8030 分析寡核苷酸序列和 LCMS-9030 分析寡核苷酸精确分子量

摘要: 使用双极性台式线性 MALDI-TOFMS MALDI-8030 建立了分析两种合成寡核苷酸碱基序列和 ESI-QTOF LCMS-9030 分析两种寡核苷酸精确分子量的方法。MALDI-8030 负离子模式源内裂解 (ISD) 可以得到丰富且响应良好的寡核苷酸碎片离子, 主要为单电荷的 W 离子, 解谱容易。此外, MALDI-TOF 操作简单、分析速度快, 结果直接可靠, 是寡核苷酸序列分析的一种有效的方法。LCMS-9030 可测定寡核苷酸的精确分子量, m/z 的观测值与理论值的偏差分别为 0.03ppm 和 0.02ppm, 质量准确度好。

关键词: 寡核苷酸 分子量 碱基序列 MALDI-8030 LCMS-9030

核酸药物是在生物反应作用机制的上游发挥作用, 不良反应较少, 是有希望治疗多种疾病的药物。利用质谱对核酸进行表征是目前备受关注的研究方向。尽管高分辨率和高精度的 ESI 质谱能准确测定核酸质量, 但进行常规寡核苷酸序列分析仍较为繁琐且困难。使用经典的 ESI-MS/MS 技术很难获得完整的内部寡核苷酸序列。此外, 使用 MALDI-TOFMS 的 In Source decay (ISD) 进行核酸序列分析也是一种有效的方法。本文将介绍 LCMS-9030 (ESI-QTOF) 和 MALDI-8030 (双极性台式线性 MALDI-TOFMS) 进行核酸表征的案例。

1. 测定条件和样品分析

1.1. 合成核酸

两种具有不同糖组分结构的硫代寡核苷酸 (LNA-Oligo 和 S-Oligo), 购自 GeneDesign(日本)。寡核苷酸的序列如图 1 所示。所有的核酸都使用 Milli-Q 水配制, 浓度为 10 pmol/mL。

LNA-Oligo	G(L) ⁵ (L) ⁵ (L) ⁵ T(L) ⁵ (L) ⁵ a ^g t ⁵ (x) ⁵ g ⁵ (x) ⁵ t ⁵ (x) ⁵ G(L) ⁵ (L) ⁵ A(L) ⁵ (L) ⁵ (L) ⁵
S-Oligo	g ⁵ (x) ⁵ (x) ⁵ t ⁵ (x) ⁵ a ^g t ⁵ (x) ⁵ g ⁵ (x) ⁵ t ⁵ (x) ⁵ g ⁵ (x) ⁵ a ⁵ (x) ⁵ (x) ⁵
Legend	N(L): LNA ⁵ (A, T, G) (small character): DNA 5(L): LNA ⁵ (5-mC DNA) 5(x): 5-methyl dC *LNA: Locked Nucleic Acid ^: Phosphorothioated

图 1. 寡核苷酸序列

1.2. MALDI-TOFMS

以 3-羟基吡咯烷酸(3-HPA)为基质, 柠檬酸铵为添加剂进行 ISD 测定。将基质溶液和样品层叠在不锈钢 MALDI 靶板上。使用双极性台式线性 MALDI-TOFMS 的 MALDI-8030 进行负离子的 ISD 分析。

1.3. ESI-QTOF

使用 LCMS - 9030 的负离子模式进行精确质量分析。以 50 mmol/L HFIP、10 mmol/L DIPEA 和乙腈为流动相, 流速为 0.2 mL/min。QTOF 的 MS 范围设置为 m/z 500 至 3000。通过 LabSolutions Insight™ 的

ReSpect 对 ESI 质谱图进行解卷积。

2. 结果与讨论

2.1 使用 LCMS-9030 分析两种寡核苷酸的精确分子量

使用 LCMS-9030 在负离子模式下对图 1 所示的两种寡核苷酸进行了精确的质量分析。可以观察到从[M-4H]⁻⁴到[M-6H]⁻⁶分布的寡核苷酸的多电荷离子（如图 2 和图 3 所示）。通过对 ESI 质谱图进行解卷积计算，得到这两个寡核苷酸的精确质量。由图 2 和图 3 可知：LNA-oligo 的分子量为 6711.6733，S-OligoL 的分子量为 6431.7241。如图 4 所示，由于 LNA-和 S-oligo 的理论质量分别为 6711.6731 和 6431.7240，m/z 的观测值与理论值的偏差分别为 0.03ppm 和 0.02ppm，质量数准确度好。

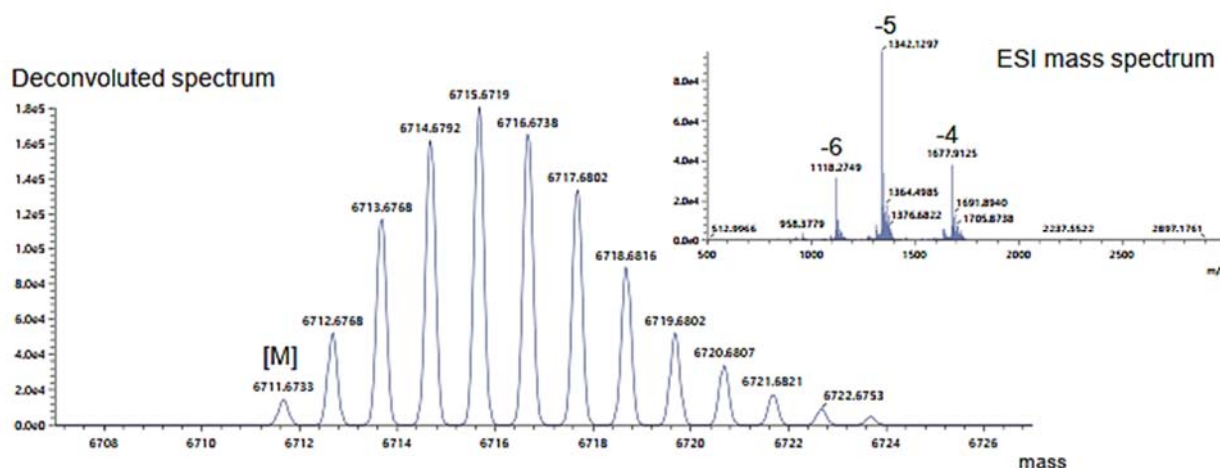


图 2. LNA-Oligo 的精确质量分析结果

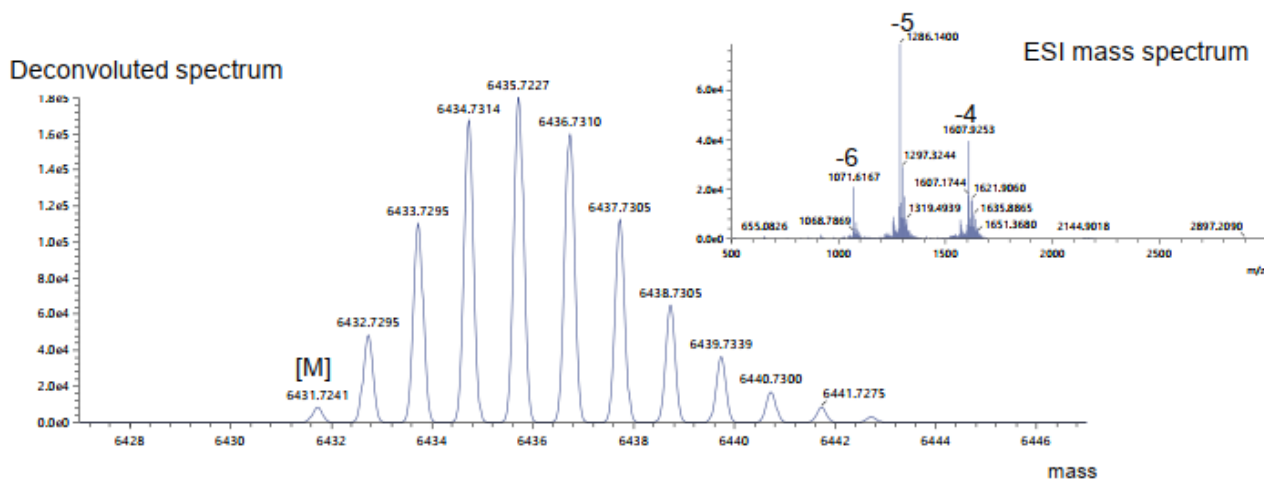


图 3. S-Oligo 的精确质量分析结果

LNA-Oligo	$C_{210}H_{264}N_{67}O_{112}P_{19}S_{19}$	S-Oligo	$C_{200}H_{264}N_{67}O_{102}P_{19}S_{19}$
calc. [M]	6711.6731	calc. [M]	6431.7240
Obs. [M]	6711.6733	Obs. [M]	6431.7241
diff./ppm	0.03	diff./ppm	0.02

图 4. 寡核苷酸质量分析的准确度

2.2 使用 MALDI-8030 分析两种寡核苷酸的精确分子量和碱基序列

使用 MALDI-8030 对两个寡核苷酸进行了负离子模式源内裂解 (ISD) 分析。MALDI-8030 从 MS 测量到 ISD 模式，只需要简单地增加激光能量，快速且容易。MALDI-ISD 裂解序列结果如图 5 和图 6 所示。图中标记为 a 及 w 的碎片离子，通过与理论平均质量匹配进行归属。在质谱图中几乎可以找到寡核苷酸序列产生的所有 w 离子。只有对应于从 3'端开始的第一个或第二个单元的 w 离子由于与基质产生的信号重叠而不能被归属。在 S-Oligo 的分析中，除了两个 5'端单元外，几乎检测到了一系列完整的 a 离子。而在 LNA-Oligo 的分析中，检测到的 a 离子完全来自内部序列，说明在这种情况下，这些 a 离子信息可以补充 w 离子所提供的序列信息。

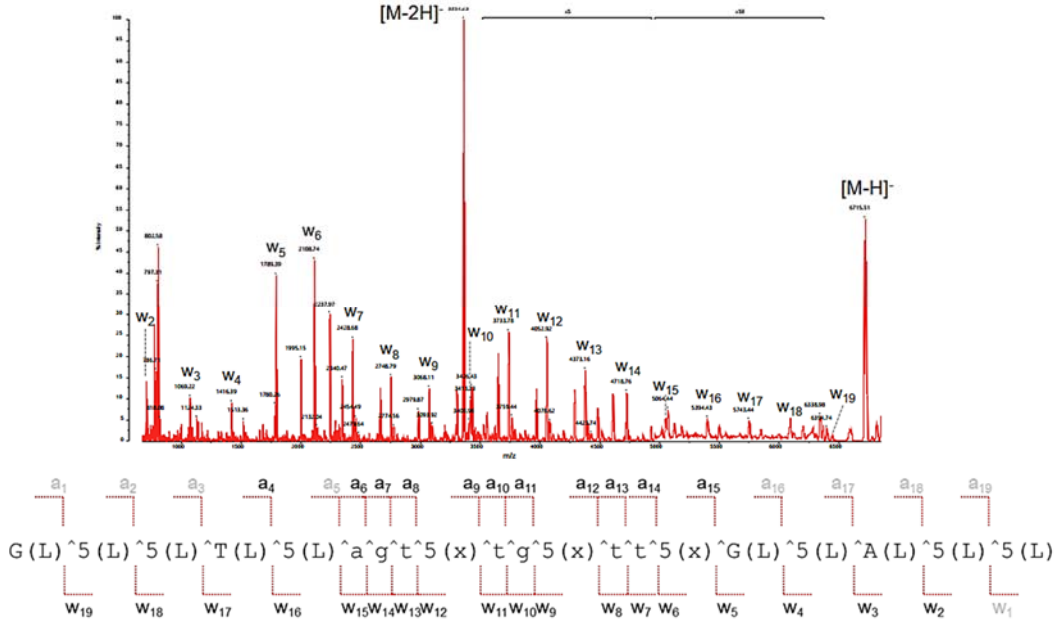


图 5. LNA-Oligo 的 ISD、及 a、w 离子的归属

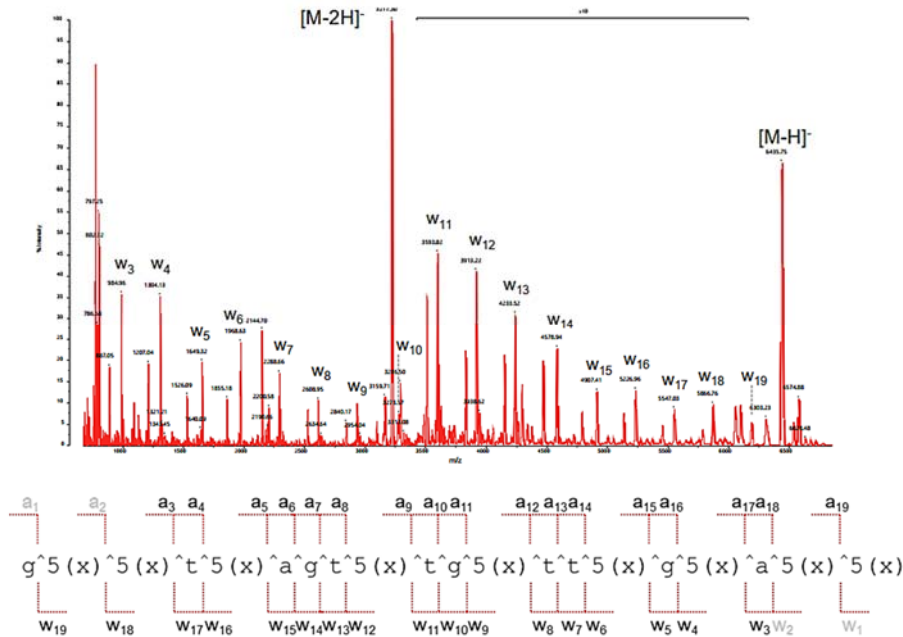


图 6. S-Oligo 的 ISD、及 a、w 离子的归属

3. 结论

使用 LCMS-9030 对寡核苷酸进行精确质量分析，得到的结果与理论质量一致性很高，**质量准确度好**。使用 MALDI-8030 的 ISD 可得到寡核苷酸的内部序列信息，无需配制流动相、操作简单、分析快速且解谱容易。因此，MALDI-ISD 和 ESI-QTOF 进行寡核苷酸的表征是有效且高效的组合。

使用双极性台式 MALDI-8030 进行合成寡核苷酸的负离子模式分析

摘要：使用双极性台式 MALDI-8030 可轻松进行合成寡核苷酸的质量检测，负离子模式下，可消除盐加合物干扰，无需脱盐处理，即可获得良好的灵敏度，简化样品制备和质谱解析。应用该技术，进行了囊性纤维化（Phe508del 变异）的基因型分析，与凝胶电泳相比，整个分析工作流程简单且快速。

关键词：寡核苷酸 分子量 MALDI-8030

合成寡核苷酸是短 DNA 或 RNA 序列，在分子生物学中有不同的应用，例如用于 DNA 测序和聚合酶链反应(PCR)扩增的引物。近来，合成寡核苷酸也被探索用于治疗 and 诊断目的，以及基于 DNA 的诊断试剂盒。

囊性纤维化是一种发生在 DNA 水平的疾病（图 1）。它是白色人种当中最为常见的常染色体隐性遗传病，由包含 27 个外显子的囊性纤维化跨膜转导调节因子（CFTR）基因突变引起，该基因位于染色体领域 7q31.2。CFTR 基因突变通过氯离子转运和抑制钠摄取，阻碍气管及导管内分泌物的正常水分供给。这主要发生在气管上皮、汗腺、消化器官（包括脾脏和胆管）以及泌尿生殖系统等主要发现 CFTR 蛋白质的区域。

除临床意义外，囊性纤维化还可用于演示教学实验室的基因分型工作流程，这是因为鉴定的多个突变 (>1500)，可能涉及不同的分子分析。这些是典型的 PCR 相关检测方法，如扩增阻滞突变系统 PCR(ARMS-PCR)，可用于 Phe508del、Gly542X 及 Asn1303Lys 突变；限制性片段长度多态性(PCR-RFLP)可用于 Arg1303Lys、Arg347Pro1) 和 arg334try3) 突变；异源双链分析(HA)可用于 Phe508del、Ile507del 和 1677delTA3) 突变。但是在这些分析中，PCR 扩增后，通常通过凝胶电泳检测产物，使用 UV 盒中的溴化乙锭染色进行读取。此工作流程费时费力，且成本较高。使用 MALDI-TOF 的替代检测方法会更容易。

MALDI-TOF MS 是一种成熟的、广泛应用于寡核苷酸分析的技术，它快速、简单，可以提供分子鉴定和序列信息。在正离子模式下分析寡核苷酸的一大挑战是在溶液中会形成钠或钾加合物，若不进行去除，则会导致灵敏度及谱峰分辨率的降低。而在负离子模式分析当中，几乎没有检测出盐加合物。本文介绍了使用双极性台式 MALDI-8030 进行囊性纤维化（Phe508del 变异）的基因型分析的案例（图 2）。我们通过消除盐加合物干扰，简化样品制备和质谱图解析，证明了负离子模式的优点。此方法可成为代替 PCR 后凝胶电泳/溴化乙锭的有效方法（图 3）。

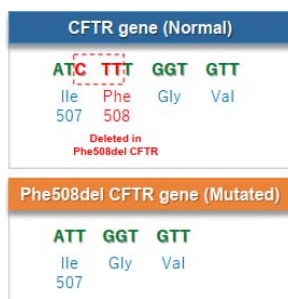


图 1. 囊性纤维化中 CFTR 基因最为常见的突变机制（Phe508del）

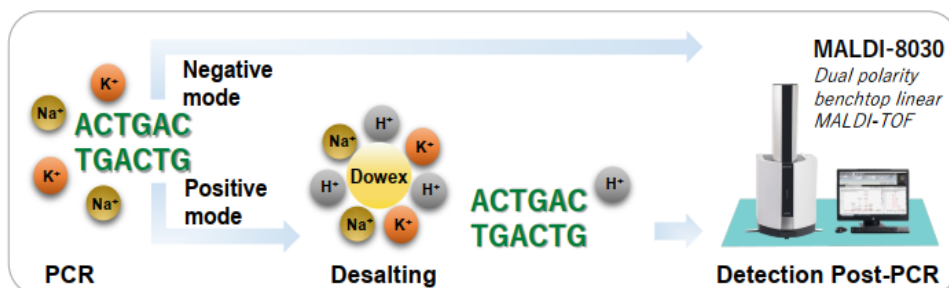


图 2. 合成寡核苷酸的分析工作流程

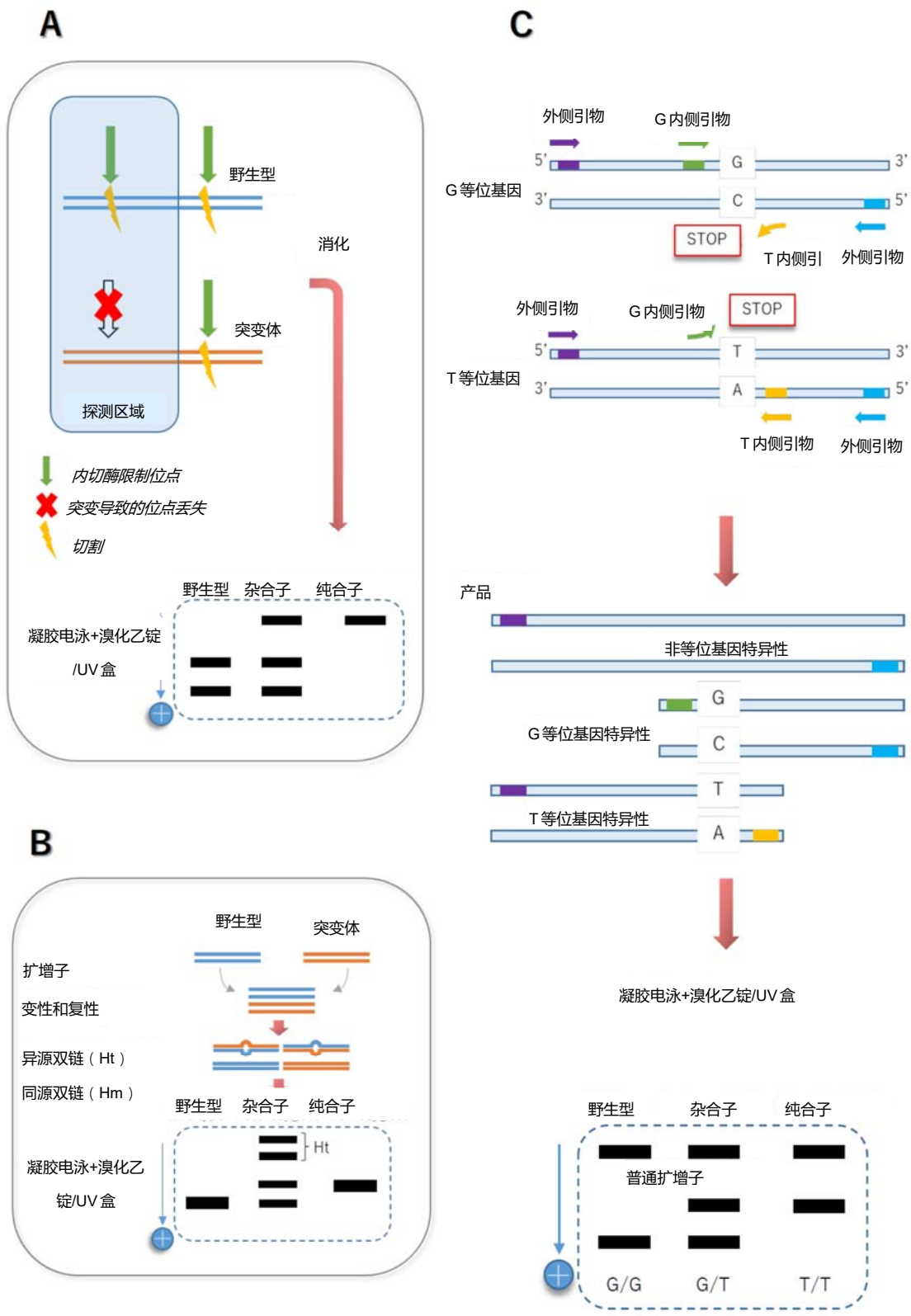


图3 使用凝胶电泳、溴化乙锭/UV盒检测寡核苷酸产物的若干常用PCR法

A) 限制性片段长度多态性聚合酶链反应 (PCR-RFLP); B) 异源双链 PCR 法; C) 扩增阻滞突变系统 (ARMS-PCR)。图片基于参考文献 1)、2)、3)。

1. 测定条件和样品分析

模拟 PCR 后生成寡核苷酸的情景。本案例基于囊性纤维化的等位基因实施。与囊性纤维化发生基因突变的 CFTR 基因序列相对应的以下合成寡核苷酸样品购自默克生命科学:ATCTTTGGTTT (野生型/正常 CFTR 基因); ATTGGTGT (Phe508del CFTR 突变基因)。柠檬酸铵二碱、Dowex 离子交换树脂及 3-羟基吡啶甲酸 (3-HPA) 也购自默克生命科学。使用 UHQ-水制备 100 μ M 寡核苷酸样品。使用 70:30 的乙腈/水制备 5 mg/mL 的柠檬酸铵盐, 用其制备 3-HPA 基质 (45 mg/mL)。

在正离子模式下测定时, 使用 Dowex 阳离子交换树脂对样品进行脱盐。在负离子模式下测定时, 未实施脱盐。样品与基质按照 1:2 混合, 然后点在靶板上。

使用脱盐及未脱盐样品, 分别在正负离子模式下, 利用 MALDI-8030 进行 MALDI 分析。

2. 结果与讨论

图 4 为囊性纤维化不同基因型的寡核苷酸负离子模式检测质谱图: A) 受试者从父母双方都继承了正常 CFTR 基因 (野生型); B) 受试者从父母双方都继承了突变型 Phe508del CFTR 基因 (纯合子); C) 受试者遗传了 1 个正常 CFTR 基因和 1 个 Phe508del CFTR 突变基因 (杂合子)。

如下所示, 计算[M-H]⁻平均的精确 m/z 值:

正常 CFTR 基因, ATCTTTGGTGT: m/z 3656.43

Phe508del CFTR 突变基因, ATTGGTGTT: m/z 2758.85

所有寡核苷酸均以良好的质量精度进行了检测。

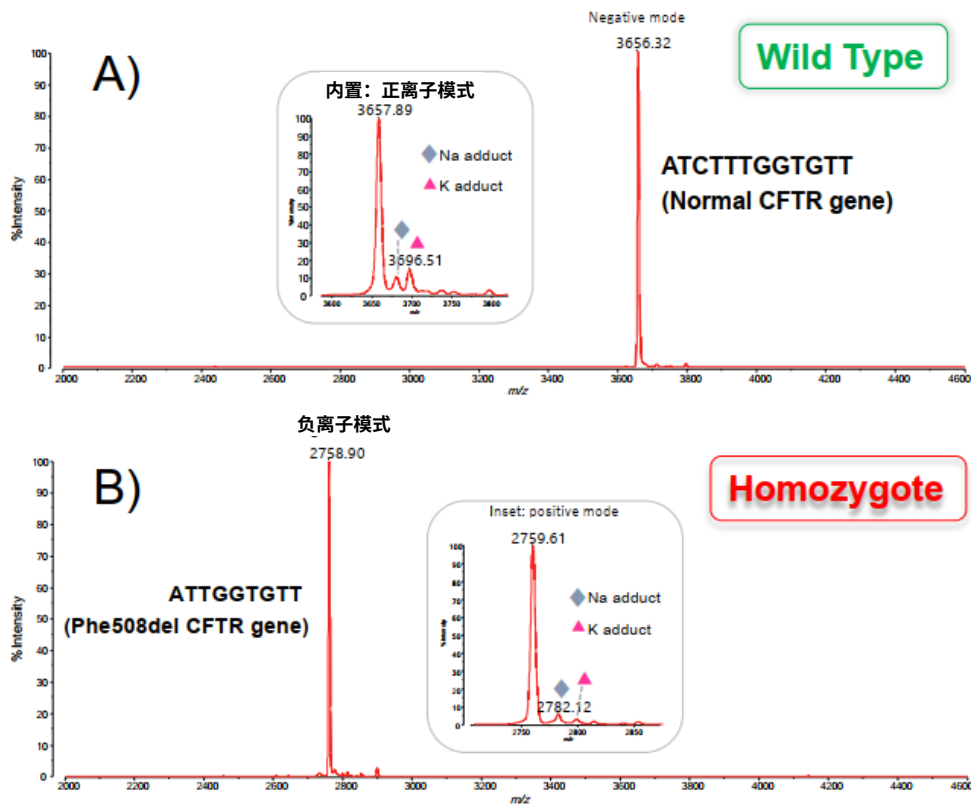


图4 (接下页) 代表囊性纤维化3种不同基因型的寡核苷酸负离子模式质谱图
A) 仅正常CFTR基因 (野生型); B) 仅Phe508 del CFTR突变基因 (纯合子)

*插入图所示为正离子模式分析下所得的寡核苷酸质谱峰。

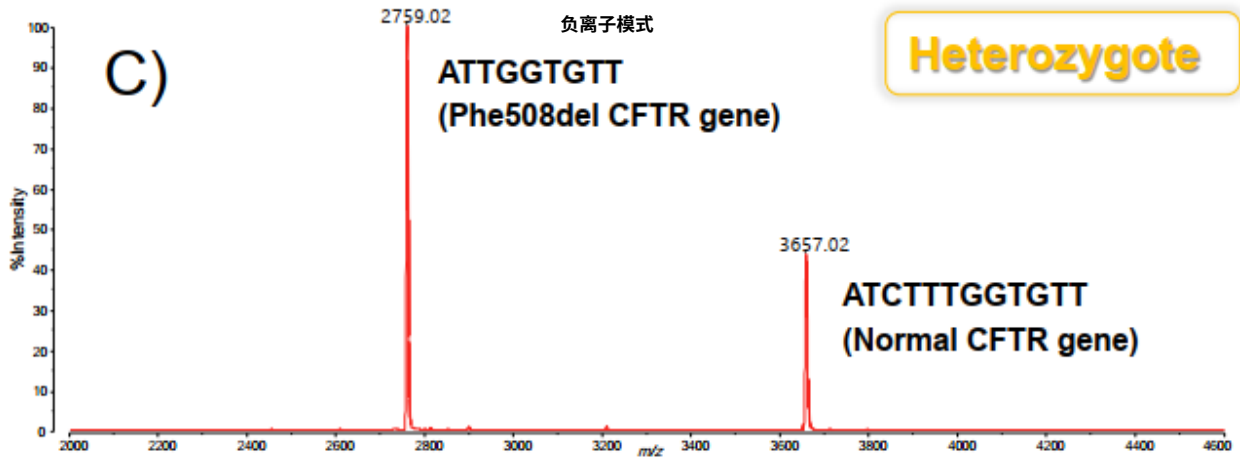


图4（接上页）代表囊性纤维化3种不同基因型的寡核苷酸负离子模式质谱图 C) 1个正常CFTR基因和1个Phe508del CFTR突变基因组成的杂合子（表示疾病载体）

图 4A 及图 4B 的插入图显示了正离子模式分析下得到的寡核苷酸谱峰。可以观察到，即使进行了脱盐（阳离子交换），在正离子模式下仍会检测出少量的钠及钾加合物。相反，在负离子模式下得到的质谱图则更干净，不含盐加合物，因此无需脱盐。

此外，从图 4A~C 的显著质谱信号可以看出，使用 MALDI-TOF MS 可以良好地进行寡核苷酸检测。本试验所用装置的性能可实现正常 CFTR 寡核苷酸与杂合子中 Phe508del CFTR 突变寡核苷酸的分离（图 4C），因此可根据野生型、纯合子及杂合子的 3 种产物结果轻松判断所有基因型。

3. 结论

本应用表明双极性 MALDI-8030 具有轻松检测合成寡核苷酸并进行质量分离的能力。

我们证明了负离子模式检测的优点，在寡核苷酸分析中无需样品脱盐的清洁步骤，同时仍然具有良好的信号灵敏度。

与凝胶电泳相比，整个分析工作流程简单且快速。因此，这项技术可以在 PCR 扩增后的实验室教学中的训练学生，也可以在更常规的实验室中进行基因分型。

4. 参考文献

- 1)."Restriction Fragment Length Polymorphism(RFLP)". Ncbi.Nlm.Nih.Gov, 2021, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/probe/docs/techrflp/>. Accessed 7 Jan 2021.
- 2).Srinivasan, Srilakshmi, and Jyotsna Batra. "Single Nucleotide Polymorphism Typing." (2019): 432-440.
- 3).Peng, Bao-yu, et al. "A novel and quick PCR-based method to genotype mice with a leptin receptor mutation (db/db mice)." Acta Pharmacologica Sinica 39.1 (2018): 117- 123.

使用 LabSolutions Insight™ Biologics 进行寡核苷酸杂质分析

摘要：本文建立了一种使用岛津超高效液相色谱-四极杆飞行时间质谱进行寡核苷酸序列确认和杂质鉴定的方法。目标寡核苷酸是长度为 20mer、经硫代磷酸修饰的寡核苷酸粗品（简称 PS20mer）。使用 LabSolutions Insight Biologics 软件测定了 PS20mer 的精确单同位素分子量，进行了序列确认，序列覆盖度良好。同时对杂质也进行了详细检索，共鉴定出不同链长、碱基缺失体、离子加合物等 30 余种杂质。对缺失 14 个核苷酸的杂质进行了序列确认，序列覆盖度良好。使用 LabSolutions Insight Biologics 软件可对寡核苷酸的杂质进行全面鉴定和序列确认，界面直观、流程简单、结果可靠。

关键词：Q-TOF LCMS-9050 寡核苷酸 序列确认 杂质鉴定

近年来，核酸药物飞速发展，作为一种新的药物发现方式受到了广泛关注。为了确认作为药物的安全性和有效性，需要对杂质进行全面检测和鉴定。本文介绍了利用四极杆飞行时间质谱仪 LCMS-9050 和 LabSolutions Insight Biologics 进行杂质分析的工作流程。

1. 实验部分

1.1 仪器

岛津生物惰性超高效液相色谱 Nexera XS inert 和四极杆飞行时间质谱联用仪 LCMS-9050，具体配置为：

系统控制器：CBM-40 脱气机：DGU-405
输液泵：LC-40D XSi 柱温箱：CTO-40S
自动进样器：SIL-40C XSi 质谱仪：LCMS-9050
色谱工作站：LabSolutions Ver. 5.120, LabSolutions Insight Biologics

1.2 分析条件

液相色谱条件

色谱柱：Shim-pack Scepte Claris C18-120, 50 mm × 2.1 mm I.D., 1.9 μm, 岛津（上海）实验器材有限公司, P/N:227-31210-02
流动相：A-含100 mM HFIP/10 mM TEA 的水溶液
B-含50 mM HFIP/5 mM TEA 的50%甲醇
流速：0.3 mL/min
进样体积：2 μL 柱温：60°C
洗脱方式：梯度洗脱，B 相初始浓度为5%，时间程序见表1。

表 1. 梯度洗脱时间程序

Time(min)	Module	Command	Value
1.00	Pumps	Pump B Conc.	5

26.00	Pumps	Pump B Conc.	40
26.10	Pumps	Pump B Conc.	90
30.00	Pumps	Pump B Conc.	90
30.10	Pumps	Pump B Conc.	5
34.00	Controller	Stop	

质谱条件

离子化模式	: ESI-	雾化气流速	: 3 L/min
加热模块温度	: 400°C	加热气流速	: 10 L/min
接口温度	: 350°C	干燥气流速	: 10 L/min
D L 温度	: 250°C	扫描模式	: MS、MS/MS (DDA)
扫描范围 m/z	: MS1 550-2500 MS2 550-2500	接口电压	: -3.0 kV

1.3 分析参数设置

LabSolutions Insight Biologics是用于寡核苷酸及其杂质特性评价的分析软件。首先，在参数设置界面中选择事先注册的核碱基、连接子、核糖、碱基修饰等来创建序列。上述核碱基、连接子、核糖、碱基修饰可自由追加和编辑。输入序列后显示分子式和单同位素质量，右侧显示结构式（图1）。可实时显示所输入序列的结构式，直观确认输入错误。

如图2所示，为了方便查看，不同核碱基部分以不同颜色显示，而且还可以显示碎片位置。

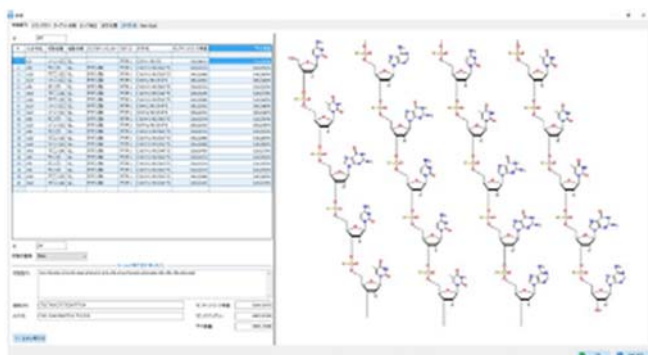


图 1 参数设置画面

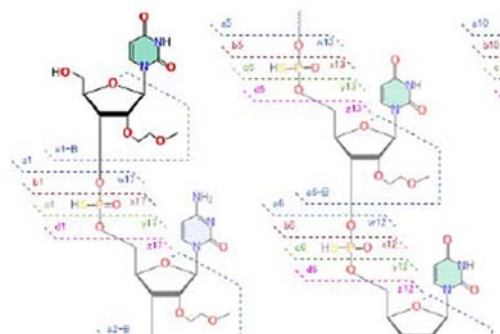


图 2 显示片段部分

在目标修饰的选项卡中选择预期的杂质。除链长差异、核碱基缺失、脱嘌呤/嘧啶、脱氨基、保护残基等的杂质、加合离子和未知修饰体之外，还可以对用户添加的分子变化进行搜索设置。

2. 结果与讨论

2.1 PS20mer 分子量确认和杂质鉴定

粗品PS20mer通过PDA和MS进行检测。LC色谱图和MS色谱图可以上下显示，方便进行峰值确认，如图3所示。MS色谱图显示为组分色谱图，基于MS1质谱，并组合不同电荷数和同位素峰的质谱信号。PS20mer的多电荷离子质谱图和解卷积质谱图如图4所示。

寡核苷酸杂质的质谱图也被解卷积，用于杂质的检索。根据 MS1 数据对杂质进行了详细的搜索，共鉴

定出不同链长、碱基缺失体、离子加合物等 30 余种杂质。

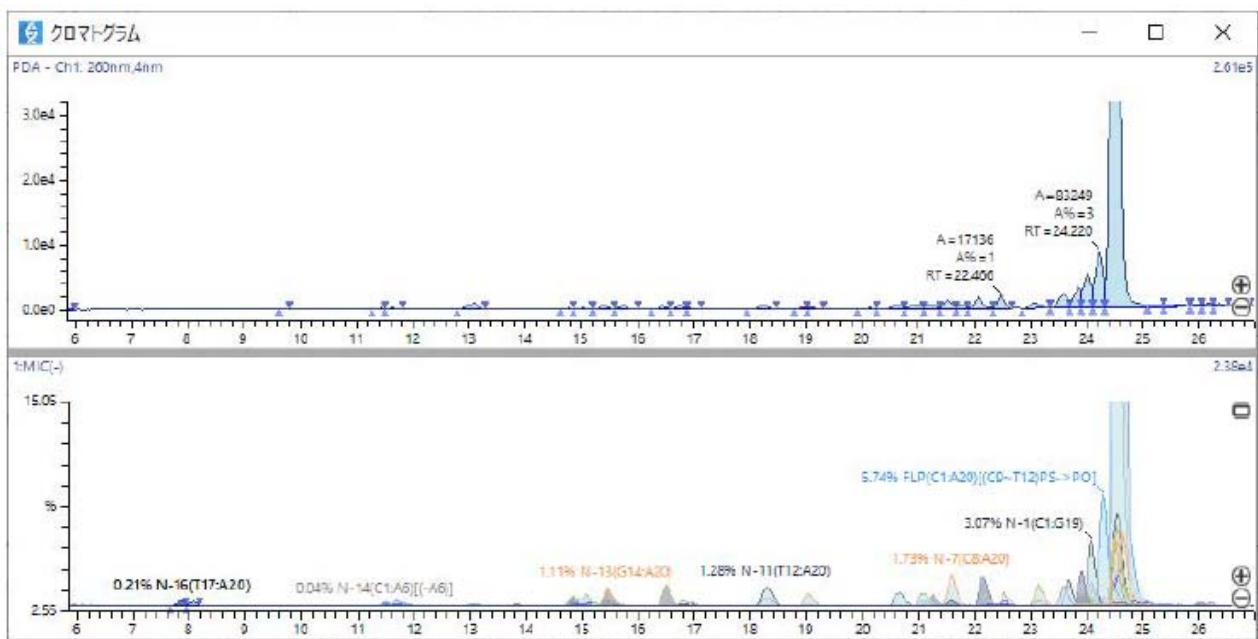


图 3 粗品 PS20mer 的 UV 色谱图（上）和组分色谱图（下）

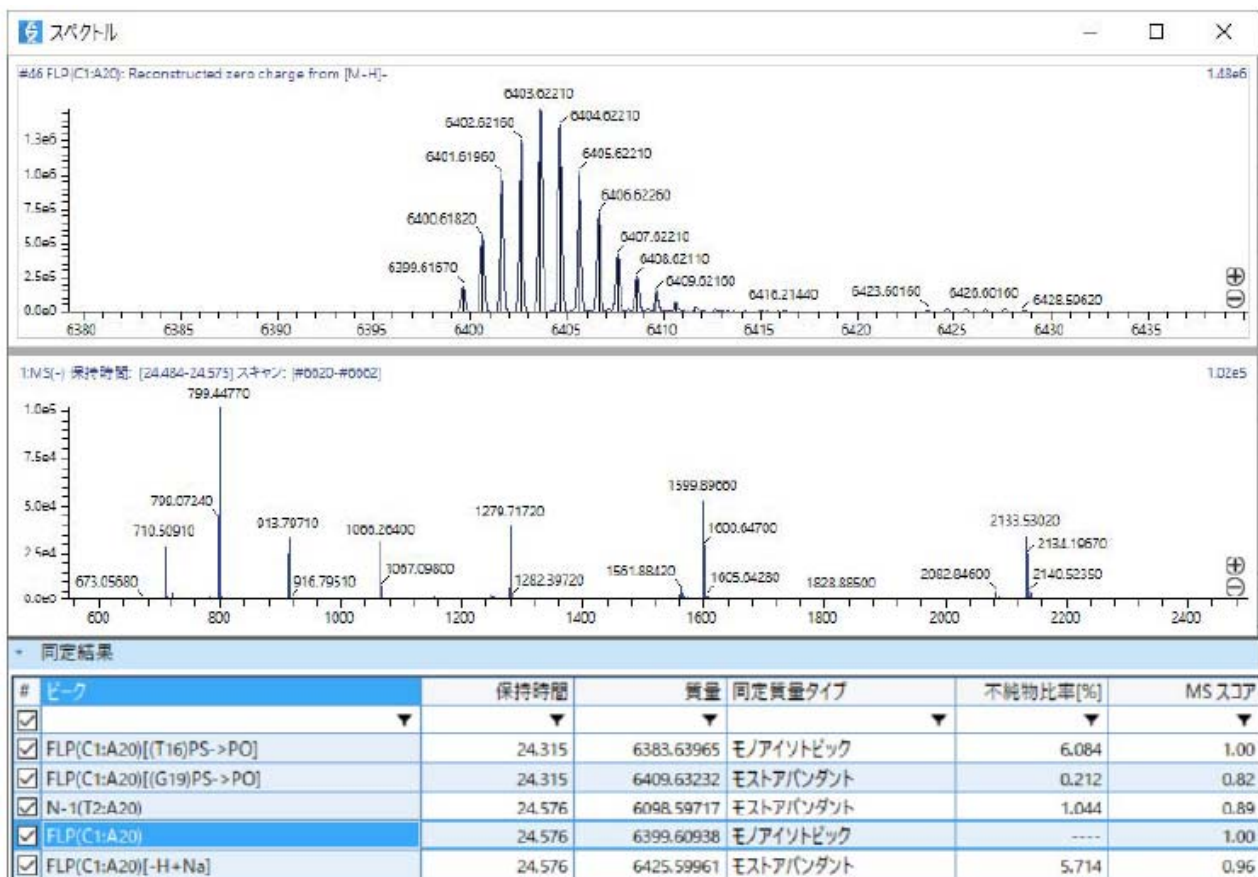


图 4 PS20mer 的质谱图（下）和解卷积质谱图（上）

2.2 PS20mer 序列确认

此外，该软件可基于MS2的碎片离子显示序列覆盖度。

碎片离子在PS20mer序列中的分配结果如图5、6所示。每个核碱基处碎裂生成的碎片离子，与序列保

持一致。序列覆盖度显示有两种模式，填充模式可查看分配离子的强度信息和全面性，分支模式可显示碎片序列，可以根据需要确认的项目进行切换。

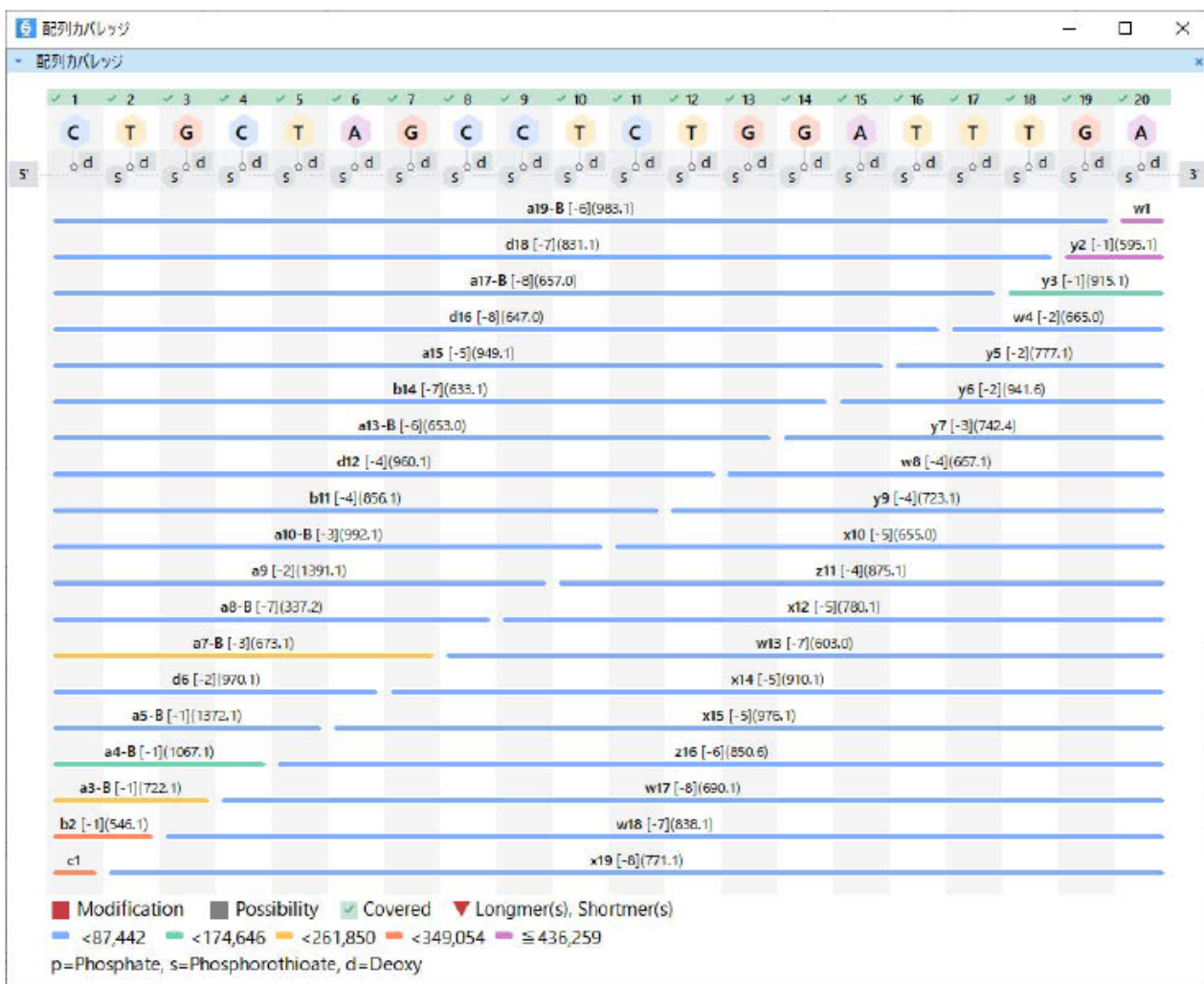


图 5 PS20mer 序列覆盖度（填充模式）

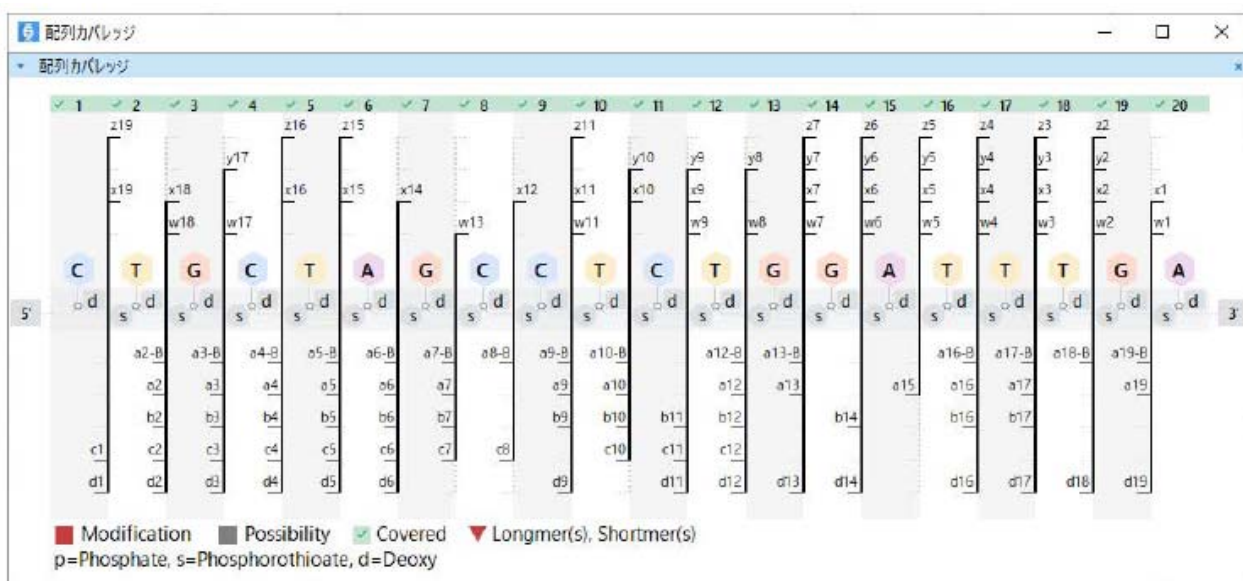


图 6 PS20mer 序列覆盖度（分支模式）

2.3 杂质序列确认

从5'端缺失14个核苷酸的杂质（下称N-14）的序列，其相对于主成分的丰度比为0.5%。如通过图7确认的核碱基上部的绿色✓标志所示，通过高覆盖度证实了分析结果的可靠性。

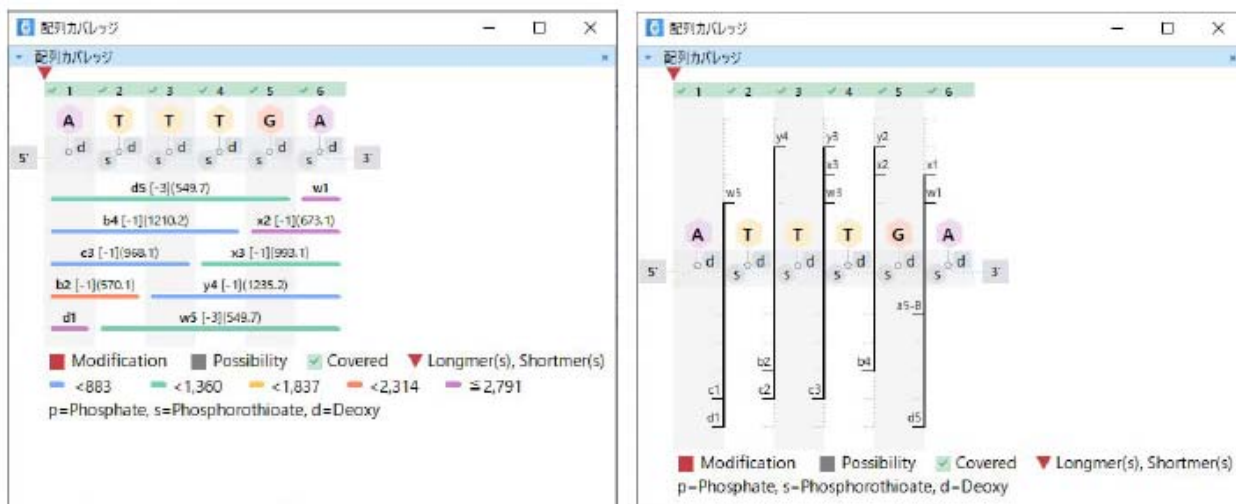


图7 N-14的序列覆盖率（填充模式:左图；分支模式:右图）

3. 结论

使用LabSolutions Insight Biologics软件可以对寡核苷酸的杂质进行全面鉴定和序列确认。不仅主要成分得到了完整的序列覆盖，丰度比0.5%的杂质也能得到很高的序列覆盖度。

利用超高效液相色谱-四极杆飞行时间质谱进行寡核苷酸分子量测定和序列确认

摘要：本文建立了一种使用岛津超高效液相色谱-四极杆飞行时间质谱进行寡核苷酸分子量测定和序列确认的方法。目标寡核苷酸是长度为 21mer、进行了 2'-O-methyl 修饰的 RNA 类型的寡核苷酸。使用 Insight Explore CSD 软件中 Respect 算法进行多电荷解卷积处理，寡核苷酸各同位素峰分离良好，单同位素质量误差 0.16 ppm。使用 Protein metrics 中 Oligo 模块进行了寡核苷酸序列确认，结果显示目标寡核苷酸序列与设计序列匹配良好。可为寡核苷酸分子量测定和序列确认提供参考。

关键词：Q-TOF LCMS-9030 寡核苷酸 分子量测定 序列确认

寡核苷酸药物通常指由化学合成生产的长度 50 个以内核苷酸组成的一类药物，包含单链或双链 DNA 或 RNA。目前研究较多的是反义寡核苷酸药物 (ASO) 和小干扰 RNA 药物 (siRNA)。与小分子药物和单抗药物靶向蛋白质不同，寡核苷酸药物通常靶向 mRNA，从转录后水平进行治疗，具有特异性好、有效性高和长效性突出的优势。

寡核苷酸药物通过固相化学合成生产，其碱基序列通常是已知的，但在合成、纯化等工艺过程中，其结构有可能发生改变，故对寡核苷酸进行分子量测定和碱基序列确认，是保证寡核苷酸碱基序列与设计序列一致的重要技术手段。寡核苷酸药物为酸性强极性化合物，通过离子对反相色谱质谱法进行分子量表征是经典的分析方法。

本文采用超高效液相色谱-四极杆飞行时间质谱，利用高精度一级质量数和二级碎裂离子信息，结合数据处理软件，对长度为 21mer 的 RNA 型的寡核苷酸进行了分子量测定和序列确认，供相关检测人员参考。

1. 实验部分

1.1 仪器

岛津 LCMS-9030 超高效液相色谱—四极杆飞行时间质谱，具体配置为：

系统控制器	: CBM-40	脱气机	: DGU-20A ₅
输液泵	: LC-40AD X3×2	自动进样器	: SIL-40C X3
柱温箱	: CTO-40C	飞行时间质谱仪	: LCMS-9030
色谱工作站	: LabSolutions Ver.5.114、LabSolutions Insight Explore CSD Protein metrics 软件 Oligo 模块		

1.2 分析条件

液相色谱条件

色谱柱	: XBridge Oligonucleotide C18 50 mm x 2.1 mm I.D., 2.5 μm;		
流动相	: A-15 mM TEA+400 mM HFIP; B-甲醇和流动相 A 等体积混合	流速	: 0.2 mL/min
进样体积	: 1 μL	柱温	: 60°C

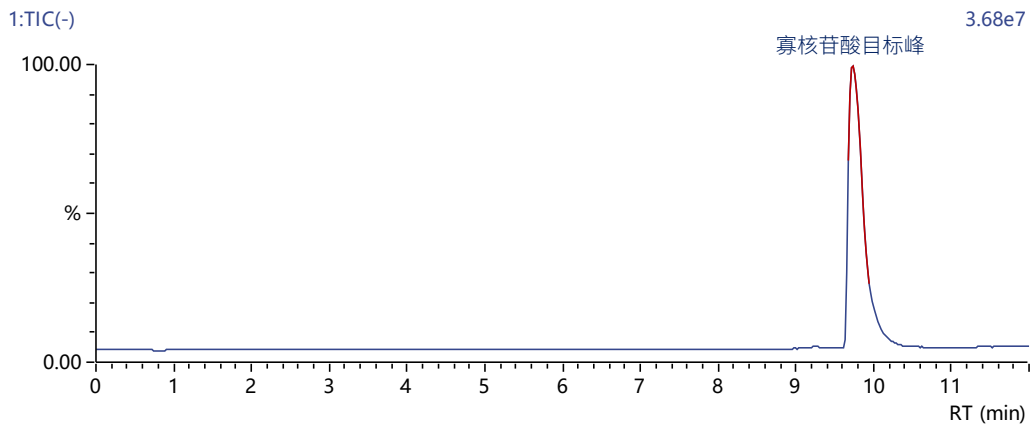


图1 寡核苷酸样品 TIC 图

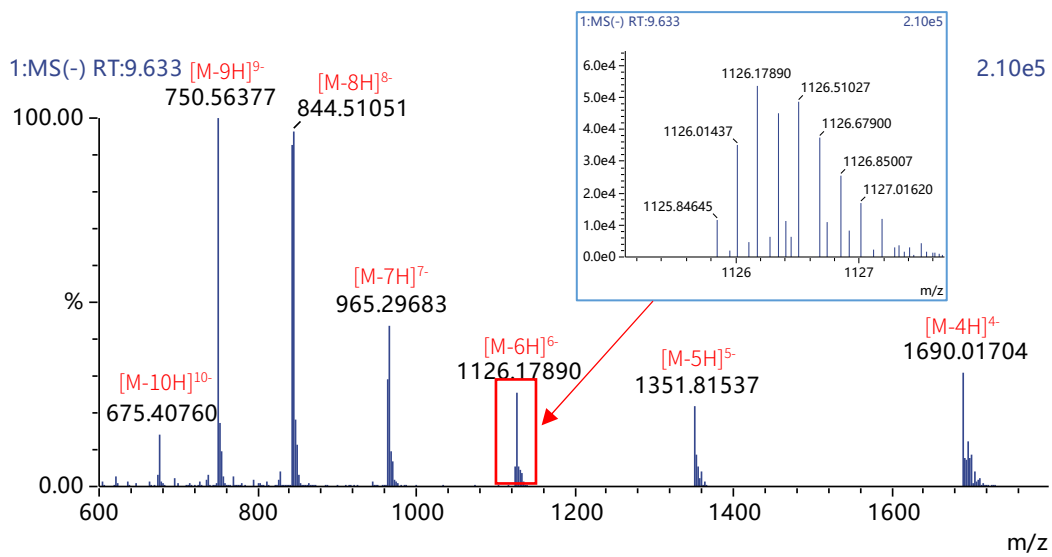


图2 寡核苷酸一级质谱图

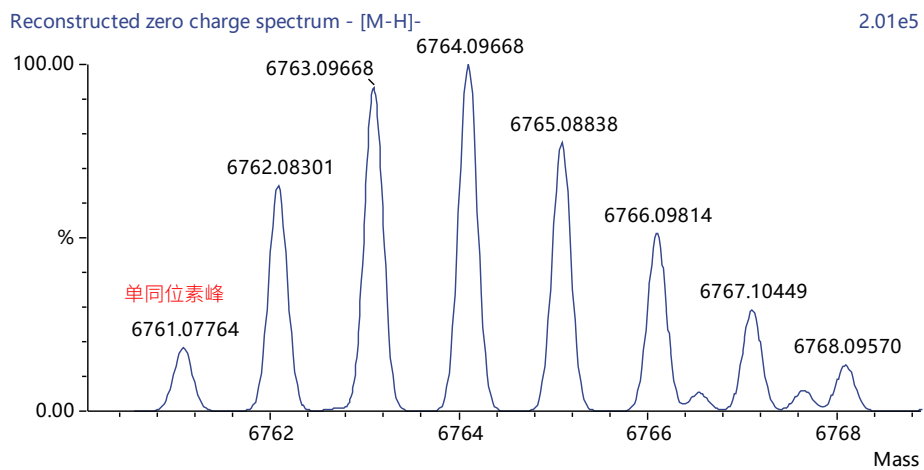


图3 寡核苷酸去卷积谱图

2.2 寡核苷酸序列确认

使用 Protein metrics 软件中的 Oligo 模块，将 LCMS-9030 采集的原始数据载入，输入寡核苷酸的设计序列，即可自动进行寡核苷酸序列确认，结果见图 4。该图是 ESI 二级质谱图，可以看到丰富的寡核苷酸

酸碎片离子，图中已标记出匹配上的寡核苷酸碎片离子类型。图中右上角是寡核苷酸设计序列，折线符号表示该位置实测碎片离子和理论碎片离子一致。由此可知，该寡核苷酸序列与设计序列匹配度良好。

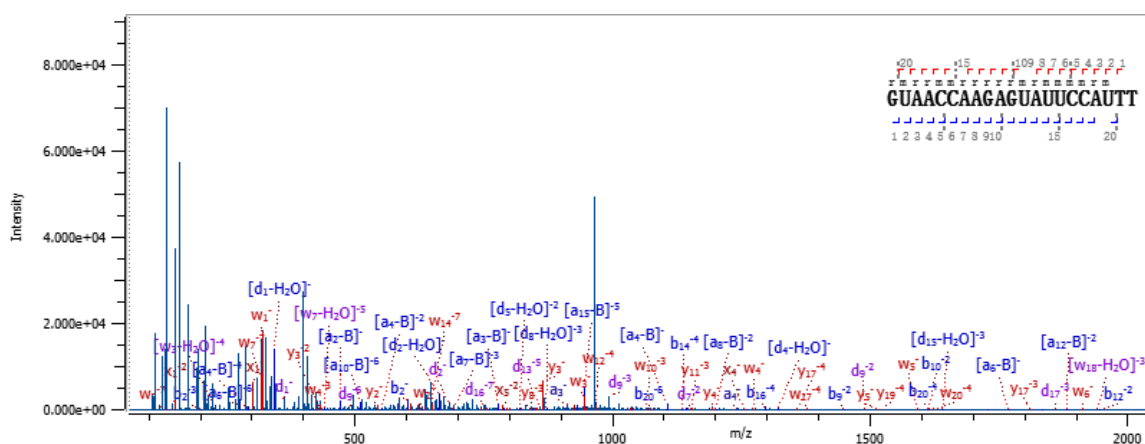


图4 寡核苷酸序列确认结果

3. 结论

使用岛津超高效液相色谱-四极杆飞行时间质谱结合 Insight Explore CSD 和 Protein metrics 数据处理软件，建立了寡核苷酸分子量测定和序列确认的方法。岛津 Q-TOF 具有高分辨、高质量数准确性和高灵敏度的特点，可以测得寡核苷酸及其碎片离子的精确质量。通过 Insight Explore CSD 中 Respect 算法可以进行高效的多电荷解卷积处理，去卷积后寡核苷酸同位素峰基本达到基线分离，轻松得到精确单同位素质量，与理论值质量误差为 0.16 ppm，质量准确度好。通过 Protein metrics 中 Oligo 模块可自动、批量、快速地进行寡核苷酸序列确认，结果直观准确。本方法操作简便、准确度高，适用于寡核苷酸药物分子量表征和序列确认。

生物惰性超高效液相色谱仪测定 siRNA 含量

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 在此系统中无明显残留。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。

本方法采用岛津生物惰性超高效液相色谱仪Nexera XS inert, 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。

1. 实验部分

1.1 仪器

生物惰性超高效液相色谱仪 Nexera XS inert, 具体配置信息如下:

系统控制器	: CBM-40	自动进样器	: SIL-40C XSi
输液泵	: LC-40D XSi	脱气机	: DGU-405
检测器	: UV	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., 3 μ m)，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 μ L

柱温：55 $^{\circ}$ C 检测器：UV

检测器温度：40 $^{\circ}$ 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 μ g/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。

2. 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 μ g/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 μ g/mL）siRNA 标准溶液后分析空白溶剂，未检出 siRNA，无残留。

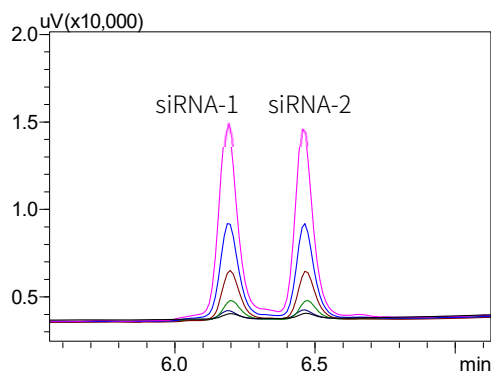


图 2. siRNA 色谱图（浓度 1~100 μ g/mL）

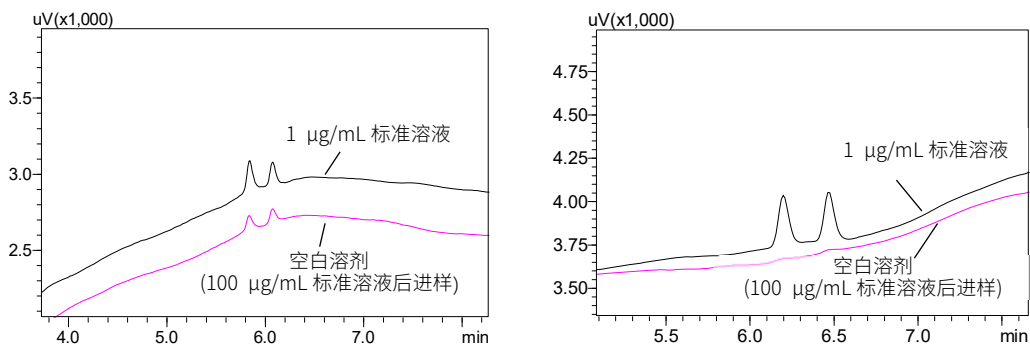


图 3. 空白溶剂与 1 µg/mL 标准溶液色谱图比较
(左: LC-40D XS+Metal 色谱柱, 右: LC-40D XSi+Metal free 色谱柱)

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。

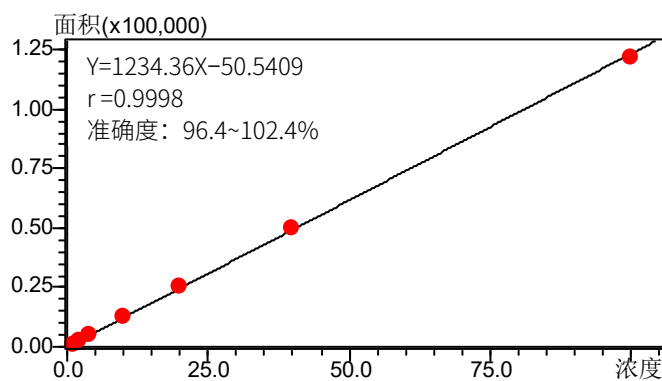


图 4. 校准曲线

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。

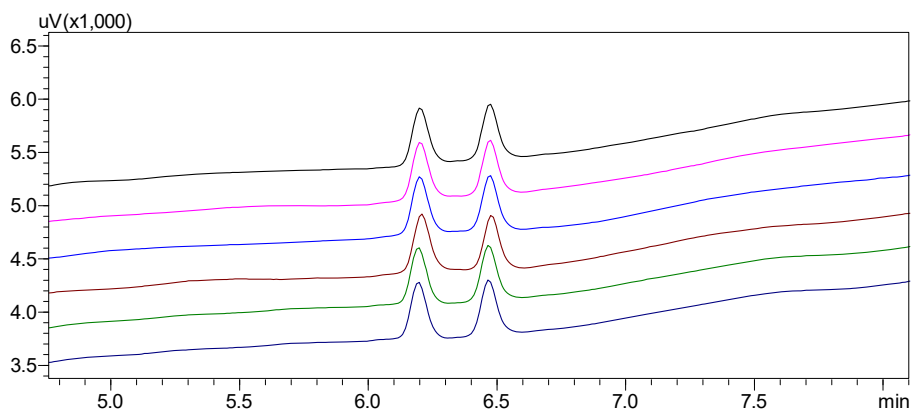


图 5. 精密度实验结果

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。

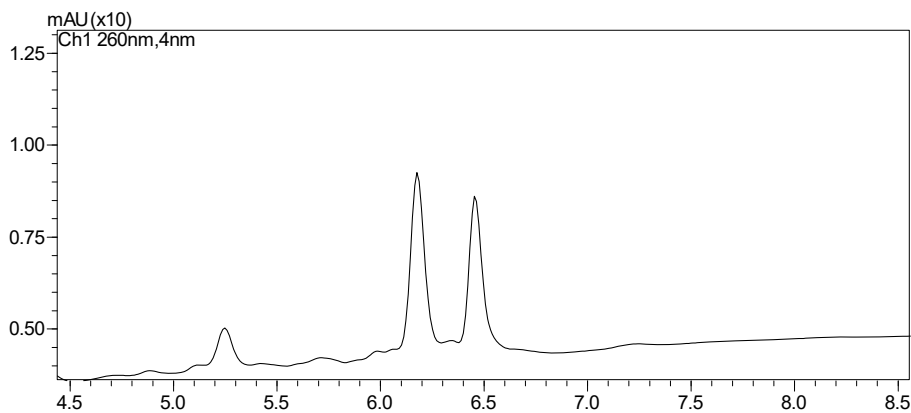


图 6. 样品色谱图

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

3. 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。

利用生物惰性液相分析 GalNAc 偶联的寡核苷酸药物纯度

摘要: 本文利用岛津生物惰性液相色谱系统 (Nexera XS inert) 结合反相离子对色谱法, 建立了 GalNAc 偶联的寡核苷酸药物的纯度分析方法。寡核苷酸药物主峰与杂质分离度良好, 且无明显残留, 方法简单、稳定、可靠, 可供相关行业参考。

关键词: 生物惰性液相系统 寡核苷酸药物 纯度 杂质

技术特点:

- ❖ Nexera XS inert 生物惰性系统, 告别金属吸附, 无残留。
- ❖ 使用 metal-free 色谱柱与 Nexera XS inert 配套使用, 可最大限度发挥出金属吸附抑制效果

寡核苷酸药物通常指由化学合成生产的长度 50 个以内核苷酸组成的一类药物, 包含单链或双链 DNA 或 RNA。近几年, 寡核苷酸药物已广泛应用于遗传疾病、肿瘤、病毒感染和感觉器官等多种疾病的治疗, 具有特异性强、靶点丰富、高效、长效等优点, 有望成为继小分子药物和抗体药物后的新一代疗法。

寡核苷酸一般由自动化的固相法合成工艺生产, 受到合成反应效率和原料纯度等多重因素的影响, 寡核苷酸药物在合成过程后会存在多种不同的杂质, 药物的杂质会影响药物的疗效并引起不良反应。因此, 有必要加强寡核苷酸药物的质量控制, 纯度是寡核苷酸药物质量控制的关键属性。

寡核苷酸含磷酸基团, 与金属接触时易产生非特异性吸附现象, 影响色谱峰峰形, 且易产生残留, 从而影响测定。岛津推出的生物惰性超高效液相色谱仪 Nexera XS inert 将高压耐受性与完全惰性的样品流路完美结合, 确保不会发生金属表面的非特异性吸附作用, 且具有超高耐腐蚀性, 从而为核酸类物质的分析提供了理想的解决方案。本文使用该套仪器对 GalNAc 偶联的寡核苷酸药物纯度进行了分析, 该方法简单、可靠、无明显残留, 可供相关从业人员参考。

1. 实验部分

1.1 仪器

本实验采用生物惰性超高效液相仪 Nexera XS inert 系统, 具体配置为:

系统控制器	: CBM-40	脱气机	: DGU-405
输液泵	: LC-40D xsi×2	自动进样器	: SIL-40C xsi
柱温箱	: CTO-40C	检测器	: SPD-M40A
色谱工作站	: LabSolutions Ver. 5.118		

1.2 分析条件

色谱柱	: Shim-pack Scepter C18-120 [Metal free] (50 mm×2.1 mm I.D., 1.9μm) , 岛津 (上海) 实验器材有限公司, P/N: 227-31072-01		
流动相	: A-15mM TEA+400mM HFIP; B-50%A+50%甲醇		
进样量	: 2.0 μL	柱温	: 50°C

流 速 : 0.2 mL/min

检测波长 : 258nm

洗脱方式 : 梯度洗脱, B相初始浓度为 52%, 时间程序见表 1

表 1. 梯度洗脱程序

Time	Module	Command	Value
10.00	泵	B.Conc	57
12.00	泵	B.Conc	57
12.10	泵	B.Conc	52
16.00	控制器	Stop	

1.3 样品前处理

称取适量样品以去离子水溶解, 配制浓度为 200ppm 的溶液, 待测。

2. 结果与讨论

2.1 标准溶液色谱图

使用 1.2 分析条件对空白溶剂进行分析, 未见干扰峰; 对样品进行分析, 主峰保留时间 11.310 min, 除主峰外, 可观测到 5 个杂质峰, 杂质峰面积, 纯度比例如下表 2 所示, 根据面积归一法计算, 寡核苷酸药物的纯度为 88.539%; 样品分析后, 再分析空白溶剂, 进而评估寡核苷酸药物的残留, 未见明显残留。

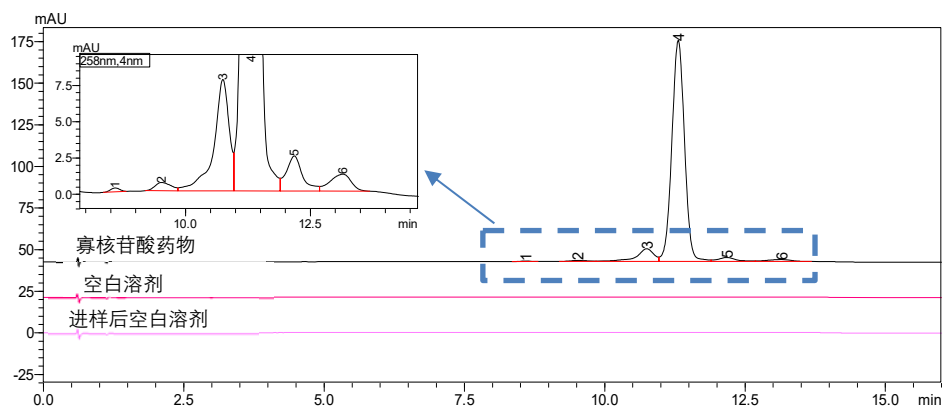


图 1 寡核苷酸药物纯度分析色谱图

表 2 寡核苷酸药物峰表

ID	保留时间	面积	面积%
1	8.591	3499	0.149
2	9.519	12670	0.538
3	10.747	164934	7.007
4	11.310	2084149	88.539
5	12.177	54357	2.309
6	13.151	34335	1.459

2.2 寡核苷酸药物重复性实验

对寡核苷酸药物重复进样 6 次, 保留时间及面积重复性如下图 2 和表 3 所示, 主峰及杂质峰的保留时间 RSD<0.14%, 面积 RSD<1.38%, 稳定性良好。

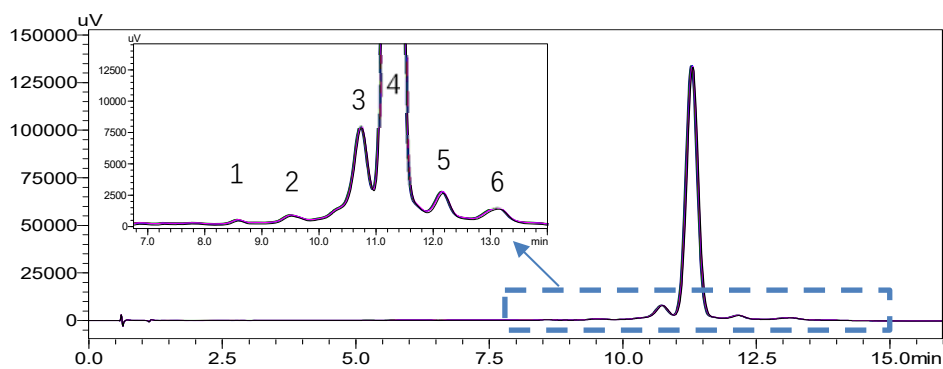


图2 寡核苷酸药物重复性色谱图

表3 寡核苷酸药物重复性分析结果 (n=6)

名称	保留时间 RSD%	面积 RSD%
1	0.14	1.38
2	0.13	0.97
3	0.12	0.45
4	0.12	0.07
5	0.12	0.78
6	0.13	0.89

3. 结论

本实验建立了一种使用岛津生物惰性超高效液相仪 (Nexera XS inert) 结合 Shim-pack Scepter C18-120 [Metal free] 色谱柱进行寡核苷酸样品的纯度分析方法。空白溶剂无干扰, 反相条件下, 样品与杂质分离良好, 且无残留。方法简单, 适用于寡核苷酸药物的质量控制。

离子交换色谱法分析寡核苷酸并考察流动相 pH 变化对分离的影响

摘要: 本文建立了一种使用生物惰性液相色谱结合离子交换色谱法分离五种不同序列长度寡核苷酸的分析方法。样品重复分析 6 次, 保留时间和峰面积的相对标准偏差 (RSD) 均小于 1%, 重复性好。使用该方法分析了未经 HPLC 纯化的样品, 保护基、短序列等杂质可与目标寡核苷酸分离。考察了流动相 pH 变化对分离的影响, 使用带过滤器的流动相瓶盖, 有利于保持流动相 pH 稳定, 从而实现良好的分析稳定性。

关键词: 离子交换色谱法 生物惰性液相 寡核苷酸

核酸类药物, 例如反义寡核苷酸, 可通过与细胞内外靶基因等的相互作用发挥药效。与传统的小分子药物不同, 可在基因水平治疗疾病, 因此继抗体药物之后, 成为备受关注的下一代生物药物。寡核苷酸药物主要通过化学合成进行制造, 其合成过程也会生成许多杂质, 例如寡核苷酸短序列和保护基团杂质, 因此需要合理地分离和纯化寡核苷酸。

本文建立了一种使用离子交换色谱法结合生物惰性液相色谱分离不同序列长度寡核苷酸的分析方法, 假定较短序列的寡核苷酸组分为合成过程中可能产生的短序列杂质, 并考察了流动相 pH 变化对分析结果的影响。岛津生物惰性超高效液相色谱仪 “Nexera XS inert” 可以出色地抑制含磷酸基团化合物的金属表面吸附, 获得优异的峰型、良好的重现性和出色的灵敏度。

1. 实验部分

1.1 分析条件

色谱柱	: Shim-pack Bio IEX Q-NP (100 mm × 4.6 mm I.D., 5 μm);		
流动相	: A-10 mmol/L NaOH; B-含 1 mol/L NaClO ₄ 的 10 mmol/L NaOH		
流速	: 0.8 mL/min	柱温	: 60°C
进样体积	: 1 μL	检测波长	: UV 260 nm
洗脱方式	: 梯度洗脱, B 相初始浓度为 25%, 时间程序见表 1。		

表 1. 梯度洗脱时间程序

Time(min)	Module	Command	Value
15.00	Pumps	Pump B Conc.	32.5
15.10	Pumps	Pump B Conc.	100
20.00	Pumps	Pump B Conc.	100
20.10	Pumps	Pump B Conc.	25
25.00	Controller	Stop	

1.2 样品处理

寡核苷酸样品序列如表 2 所示, 目标寡核苷酸序列长度为 20 mer。序列长度 16~19 mer 的寡核苷酸被

假定为合成过程中产生的短序列杂质。两者均为未修饰的单链 DNA，通过固相合成法（HPLC 纯化）制备。将表 2 中五种序列长度的寡核苷酸以水溶解，配制为 5 $\mu\text{mol/L}$ 的混合标准品。

表 2 寡核苷酸样品

No.	Sequence (5'→3')	Length (mer)
1	TCTTGGTTACATGAAA	16
2	TCTTGGTTACATGAAAT	17
3	TCTTGGTTACATGAAATC	18
4	TCTTGGTTACATGAAATCC	19
5	TCTTGGTTACATGAAATCCC	20

2. 结果与讨论

2.1 寡核苷酸混合样品色谱图

离子交换色谱法通常根据寡核苷酸中的磷酸基数量，即负电荷差异进行分离。因此，通常按照链长由短至长的顺序洗脱。5 种序列的寡核苷酸混合样品的色谱图如图 1 所示。可见，各寡核苷酸根据序列长度进行分离。

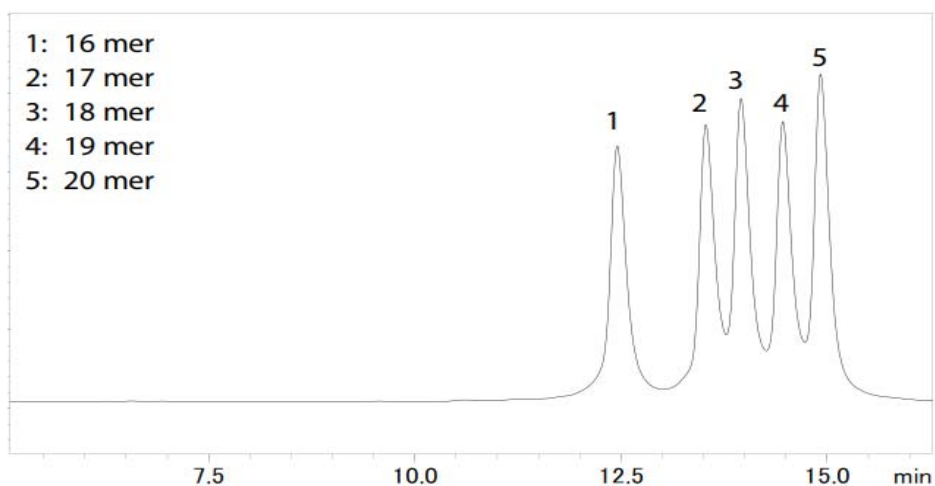


图 1 寡核苷酸混合样品的色谱图

2.2 重复性

16~20 mer 的寡核苷酸混合样品，重复分析 6 次，保留时间和峰面积的相对标准偏差（RSD）如表 3 所示。两项指标均低于 1%，分析重复性良好。

表 3 各成分相对标准偏差 (n=6)

长度(mer)	保留时间(RSD%)	峰面积(RSD%)
16	0.138	0.224
17	0.105	0.335
18	0.098	0.494
19	0.085	0.161
20	0.075	0.307

2.3 含杂质的混合样品分析

4种序列的寡核苷酸样品经过HPLC纯化，1种序列的寡核苷酸样品仅进行脱盐处理，未经HPLC纯化，将这五种序列长度的寡核苷酸样品配制为5 μ mol/L的混合样品。

包含脱盐纯化品的混合样品与仅包含HPLC纯化品的混合样品空白色谱图如图2所示。发现不仅可以分离目标寡核苷酸，还可以分离游离保护基等杂质和不完全长度寡核苷酸链等杂质。

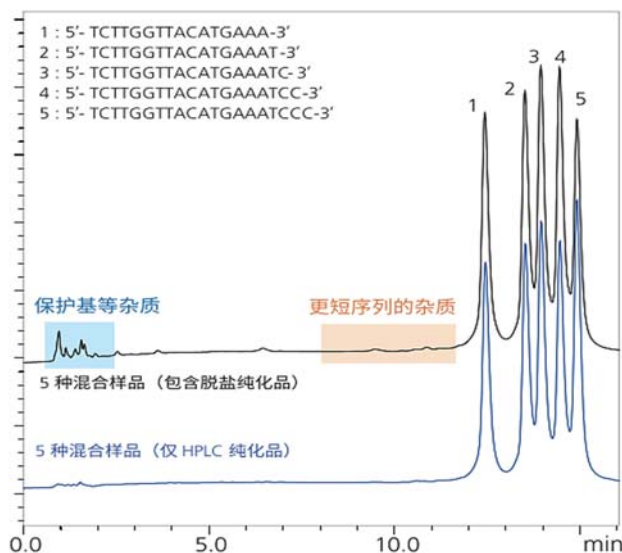


图2 包含杂质的寡核苷酸混合样品的色谱图

2.4 流动相 pH 变化对保留时间产生的影响

如前文所述，使用离子交换色谱法分析寡核苷酸时，通过盐浓度梯度使目标物分离、洗脱。众所周知，碱性流动相会吸收空气中的二氧化碳，导致pH发生改变。离子交换色谱法根据分析物电荷差异进行分离，故流动相pH的微小变化可能对分析结果产生较大影响。因此，为了获得稳定的分析结果，抑制流动相的pH变化至关重要。

于是，我们比较了使用标准流动相瓶盖和带有能防止流动相挥发的过滤器的流动相瓶盖，分别在流动相制备当天和2天后进行分析的效果。各自的寡核苷酸混合样品色谱图如图3所示，以制备当天的值为100，各流动相pH的变化率如图4所示。

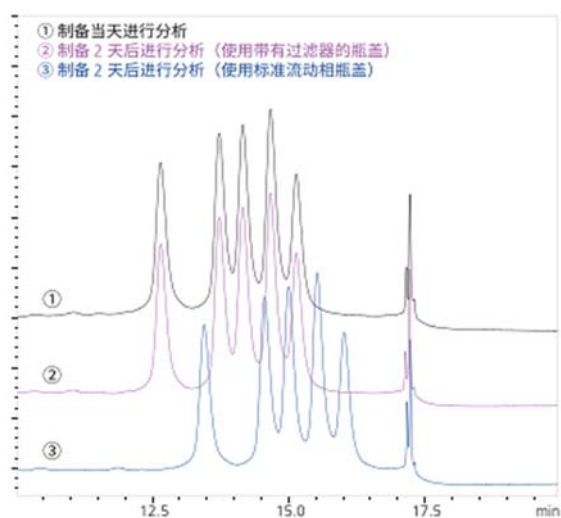


图3 流动相制备当天及2天后 寡核苷酸混合样品的色谱图

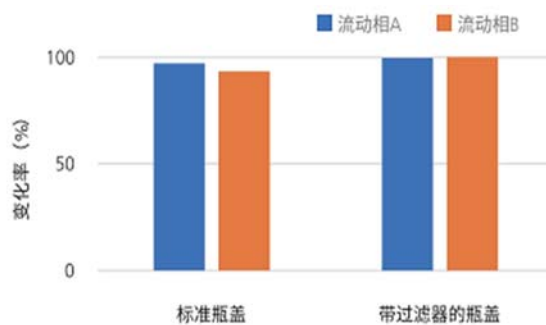


图4 相比流动相制备当天，制备2天后的pH变化率

使用标准流动相瓶盖时，与流动相制备当天（①）相比，随着pH的变化，保留时间平均增加8%（③），而使用带有过滤器的瓶盖时，保留时间几乎没有变化（②）。由此可知，使用带有过滤器的瓶盖可抑制流动相pH的变化，获得稳定的分析结果。

3. 结论

本文介绍了使用离子交换色谱法结合Nexera XS inert和Shim-pack Bio IEX分析寡核苷酸的案例，可将化学合成过程中产生的保护基等杂质、以及不完全合成产生的不同链长的寡核苷酸与目标寡核苷酸成功分离，展现了良好的重现性。由于流动相的pH变化会对分析物的保留时间产生影响，因此流动相的pH控制对于稳定地分析十分重要。此外，使用生物惰性系统也有助于获得良好的分析稳定性。

采用 Tm 分析系统分析核酸药物解链温度

摘要 近年来，以核酸药物为首的功能性核酸备受关注，在研发和评价这种功能性核酸时，热稳定性是很重要的指标，它是控制结构和功能的因素。此外，热稳定在基于核酸杂交的方法（如 PCR 和 DNA 微阵列）中也是必不可少的。本文使用紫外可见分光光度计 UV-1900i 和 Tm 分析系统（TMSPC-8）进行了核酸的解链温度测试，对于核酸药物热稳定性评价起到指导作用。

关键词 UV-1900i Tm 分析系统 核酸 解链温度 (Tm)

以核酸药物为首的功能性核酸备受关注，2021 年底治疗罕见病脊髓性肌肉萎缩的反义寡核苷酸药物诺西那生钠进入中国医保，几乎同一时间，某医药公司降血脂的小干扰 RNA 药物 Leqvio 获 FDA 批准上市，据悉一年只需用药两次。寡核苷酸药物已经从罕见病过渡到了常见慢性病，并可大大降低患者用药频率。随着寡核苷酸类药物的陆续上市，核酸药物已成为当前生命科学和药物研究的热点之一。

核酸类药物又称核苷酸类药物，是各种具有不同功能的寡聚核糖核苷酸(RNA)或寡聚脱氧核糖核苷酸(DNA)，主要在基因水平上发挥作用。有些核酸药物具有双链螺旋结构，但当温度升高时，氢键断裂，双链逐渐解体，形成单链结构。这种现象称为核酸的“溶解”，将双链和单链所占比例相等的温度定义为解链温度 (Tm)。Tm 值是表征核酸热稳定性的指标，Tm 取决于碱基序列、核酸浓度、错配（非互补性碱基配对）等。核酸在 260nm 附近有一个紫外吸收峰，吸收值在“溶解”过程中增加。Tm 分析系统测定该吸光度变化，以确定 Tm 值。

本文使用紫外可见分光光度计 UV-1900i 和 Tm 分析系统（TMSPC-8）进行了核酸的解链温度测试，对于核酸药物热稳定性评价起到指导作用。

1. 实验部分

1.1 仪器

UV-1900i、Tm 分析系统（TMSPC-8）



图 1. 岛津 UV-1900i+Tm 分析系统

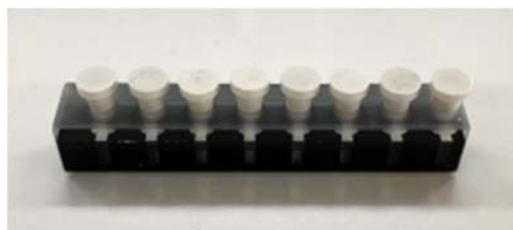


图 2. 8 联微量比色皿

1.2 测试条件

表 1 测试条件

分析仪器	UV-1900i、Tm 分析系统 TMSPC-8
测定波长	260 nm
狭缝宽	1 nm
池空白校正	启用
起始温度	20 °C
起始保留时间	120 s
升温速率	1.0 °C/min
等待测定	30 s
测定间隔	1 °C
结束温度	90 °C

1.3 测试过程

将样品稀释到一定浓度，保证在 260 nm 处的吸光度为 0.1~1 Abs 之间。然后进行了样品溶液脱气的预处理（如果溶液中空气，在高温下会产生气泡，无法准确测定）。8 联微量比色皿的光程有 10 mm 和 1 mm 两种，最小样品分析体积分别为 100 μ L 和 35 μ L，可根据样品的吸光度（浓度和样品量）来选择。本文使用光程为 10mm 的 8 联微量比色皿进行测试。

2. 测试结果

2.1 样品 1 测试曲线

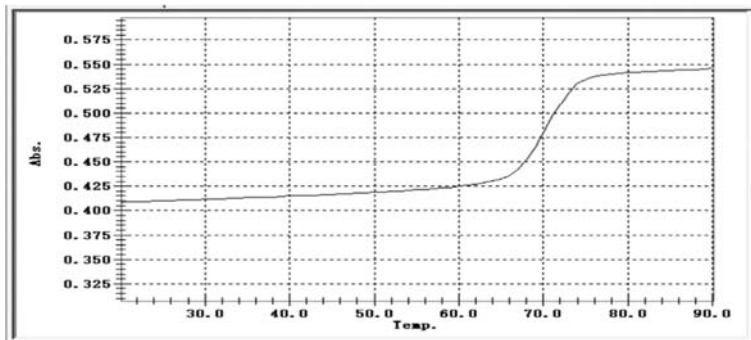


图 3. 样品 1 的 Tm 曲线

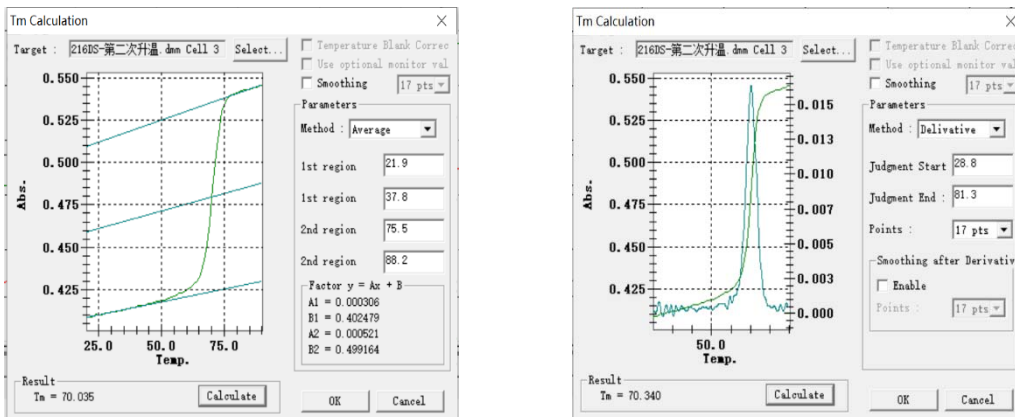


图 4. 样品 1 的 Tm 计算方法（左边中线法，右边导数法）

2.2 样品 1 测试结果

表 2 样品 1 测试结果

计算方法	Tm (°C)
中线法	70.035
微分法	70.340

2.3 样品 2 测试曲线

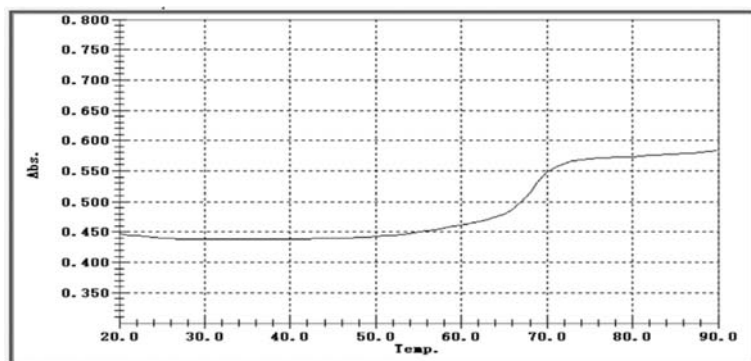


图 5. 样品 2 的 Tm 曲线

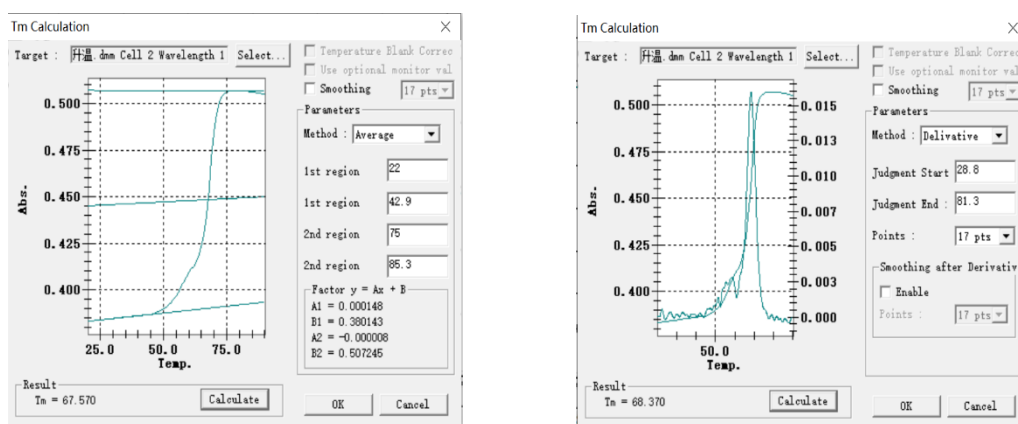


图 6. 样品 1 的 Tm 计算方法 (左边中线法, 右边导数法)

2.4 样品 2 测试结果

表 3 样品 2 测试结果

计算方法	Tm (°C)
中线法	67.570
微分法	68.370

2.5 结果分析

图 3 和图 5 显示了通过 Tm 分析软件测定获得的核酸样品 Tm 曲线, 绘制 260nm 处的吸光度对温度曲线, 显示了升温时的结果, 吸光度随温度升高而增大。

Tm 值通过中线法和微分法两种计算方法进行了计算。在中线法中, 对前跃迁区域、后跃迁区域中选择的每个区间分别绘制切线, 并计算两条切线的中线与吸光度曲线的交点作为 Tm 值 (解链温度)。在微分法中, 对设定区间内的各设定点数进行一阶微分运算, 计算显示其最大值的位置的温度作为 Tm 值 (解链温度)。

3. 结论

本文使用紫外可见分光光度计 UV-1900i 和 Tm 分析系统 (TMSPC-8) 进行了核酸的热稳定性分析 (Tm 分析), 专用 8 联微量比色皿可以同时最多测定 8 个样品。利用本系统, 测试得到 260 nm 处吸光度随温度升高的变化曲线, 通过中线法和微分法两种方法计算出 Tm 值, 对核酸药物热稳定性评价起到指导作用。

三、mRNA 疫苗分析

mRNA 疫苗/药物是将含有编码抗原蛋白的 mRNA 导入人体,直接进行翻译,形成相应的抗原蛋白,从而诱导机体产生特异性免疫应答,达到预防免疫的作用。mRNA 疫苗具有研发周期短、生产工艺简单、安全性良好等特点。国家药品监督管理局 (NMPA) 药品审评中心于 2020 年 8 月颁布的《新型冠状病毒预防用 mRNA 疫苗药学研究技术指导原则(试行)》建议对 DNA 转录模板、mRNA 原液和 mRNA-LNP 成品进行质量控制,涉及 mRNA 纯度、加帽率、Poly A 尾、模板 DNA 残留、双链 RNA (dsRNA) 残留等特有分析参数。

mRNA 药物和疫苗的生产流程包括质粒 DNA 的扩增纯化、mRNA 体外转录、体外修饰(加帽、加尾)、脂质体包被等过程。mRNA 的帽结构能保护 mRNA 的 5' 端不被降解,并能促使翻译的起始,因此 mRNA 的加帽率是 mRNA 原液质控的重要标准之一。本章介绍了使用岛津 MALDI-TOF 对共转录加帽后的 mRNA 样品和酶法加帽反应后 mRNA 加帽产物进行帽子端分析的应用案例,可直接检测到样品中帽子的形式及相对含量。方法操作简单、检测成本低、分析速度快,结果直接、准确、可靠。

mRNA 疫苗原料中残留的模板 DNA 或相关酶可能造成不良反应,威胁人体健康。因此,需要对原料 mRNA 纯度进行研究。本章介绍了一种使用岛津生物兼容液相系统(Nexera Bio)结合 SHIMEN Ankylo C18-300S 色谱柱进行 mRNA 纯度分析的方法。mRNA 与模板 DNA、双链 RNA (dsRNA) 分离良好。方法简单,重复性好,适用于 mRNA 疫苗原料的质量控制。

mRNA 容易被体内核酸酶降解,为了保护 mRNA 不被降解并使其顺利穿过细胞膜需要采用脂质纳米粒(LNP)或其他递送系统进行包裹,然后递送至细胞内。mRNA 和递送系统形成的新结构的粒径大小、结构可能会影响到 mRNA 递送和表达,有必要对 mRNA 和递送系统形成的结构进行形貌表征。本章介绍了一种使用岛津扫描探针显微镜(SPM)技术,测定 mRNA 疫苗样品粒径大小和表面形貌的方法,对 mRNA 疫苗样品制备过程的优化具有一定指导和参考意义。

mRNA 药物及疫苗生产过程需要用到多种原料,其中用于 mRNA 体外转录与修饰(加帽、加尾)环节的原料对保证 mRNA 的质量及有效性至关重要。mRNA 体外转录的直接原料为 NTP (ATP、UTP、CTP、GTP),加帽加尾由于采用的修饰路线不同原料有所不同。本章介绍了一种应用 MALDI-TOF 对 mRNA 体外转录原料以及 mRNA 加帽原料帽子类似物进行了分析,方法操作简单、检测成本低、分析速度快,结果直接、准确、可靠,有望在 mRNA 合成核酸原料质控方面有更加广泛的应用。

DNA 质粒具有 3 种基本构型:超螺旋(Supercoiled,简称 SC)、线性(Linear)和开环(Open circular,简称 OC)。其中超螺旋被认为是能够最有效地提高转染效率和目的基因表达量的质粒形态。在基因治疗的研究中更是对药用质粒的超螺旋含量做了明确要求(FDA:>80%, NMPA:≥90%, SMPA:>85%)。所以很有必要将三种质粒分离,并对其含量进行确定。本章介绍了一种使用生物惰性液相色谱仪成功分离质粒三种构型,并测定相对含量的应用例,分离度好、重复性佳,适用于质粒中三种构型的检测。

本章汇集 mRNA 纯度、加帽率、mRNA 疫苗样品粒径大小和表面形貌、体外转录和加帽原料分析、质粒 DNA 三种构型的含量分析等应用案例,涉及 MALDI-TOF、生物惰性液相、扫描探针显微镜(SPM)等多种仪器,内容丰富,供您参考!

应用台式 MALDI-TOF MS 对共转录加帽后 mRNA 的帽子端进行定性分析

摘要: 本文应用岛津台式基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱 MALDI-8020 对 mRNA 加帽样品进行质谱分析, 可直接检测到样品中帽子的形式及相对含量, 表明台式 MALDI-8020 可以简便、快捷地对共转录加帽后的 mRNA 进行帽子端的分析, 为 mRNA 药物和疫苗的质量控制提供方法参考。

关键词: 基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱 MALDI-TOF mRNA 加帽

mRNA 药物和疫苗的生产流程包括质粒 DNA 的扩增纯化、mRNA 体外转录、体外修饰 (加帽、加尾)、脂质体包被等过程。mRNA 的帽结构能保护 mRNA 的 5' 端不被降解, 并能促使翻译的起始, 因此 mRNA 的加帽率是 mRNA 原液质控的重要标准之一。

mRNA 的帽子指 m⁷GPPP 结构的甲基鸟苷帽子, 包括 cap0、cap1、cap2 三种形式。cap0 主要存在于单细胞生物中, 结构为 m⁷GPPP (G 的第 7 位碳原子被甲基化); 如果 RNA 的第一位核苷酸的 2' -O 发生甲基化, 形成 m⁷GPPPm 的结构, 则为 cap1, cap1 在真核生物中普遍存在; 如果 RNA 的第 1、2 位核苷酸的 2' -O 位均甲基化 (第 2 位必需是 A), 成为 m⁷G-PPPmNm, 则为 cap2, cap2 的发生较少。常见的 mRNA 的加帽方法包括共转录加帽以及单独使用加帽酶进行转录后加帽两种。共转录加帽为一步法加帽, 在转录时加入帽子类似物, 可直接生成 cap1 的帽子结构。

本文应用台式 MALDI-TOF 质谱仪 MALDI-8020 对共转录加帽获取的 mRNA 进行了帽子端的分析。

1. 实验部分

1.1 仪器

台式基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱仪 MALDI-8020

1.2 分析条件

调谐模式	: 线性正离子模式	激光器	: 355 nm 固态激光器
扫描范围	: m/z 5000-10000	激光能量	: 135

1.3 样品前处理

将 mRNA 按照标准前处理流程, 将含有帽子结构的 5' 端核苷酸序列进行酶解和纯化, 得到待分析的样品溶液。吸取 1 μ L 样品溶液和 1 μ L 3-HPA (3-羟基吡啶甲酸) 基质溶液 (50 mg/mL) 依次点靶, 自然干燥后将靶板送入质谱分析。

2. 结果与讨论

对两份处理好的 mRNA 样品应用 MALDI-8020 进行质谱检测，质谱图见图 1、图 2。质谱图中均观测到 cap1 离子峰，质荷比约 7678，与理论值 (m/z 7678.6) 一致，未检测到 uncap (m/z 7384.5) 的离子峰，表明 mRNA 样品的加帽效率非常高，不含 uncap 或者 uncap 的含量低于 MALDI 的检测限。同时，未检测到 cap0 (m/z 7664.6)，与样品中帽子的结构形式为 cap1，不含 cap0 一致。检测结果统计见表 1。

除帽子外，样品中还检测到探针的离子峰 (m/z 8086)，为前处理过程中引入。另外，还检测到 m/z 6238、 m/z 7938 等离子峰，可能是样品在前处理环节产生的杂质。两份样品质谱图中离子分布模式相似，平行性较好，表明加帽及酶切等前处理实验环节重复性较好、质谱检测稳定可靠。

表 1. mRNA 加帽样品检测结果

帽子	[M+H] ⁺ 理论值	样品 1 检测值	样品 2 检测值
uncap	7384.5	-	-
cap0	7664.6	-	-
cap1	7678.6	7678.0	7677.8

cap1 序列: m7GpppmAGGAAUAAGAGAGAAAACUCU, 平均分子质量 7677.6 Da。

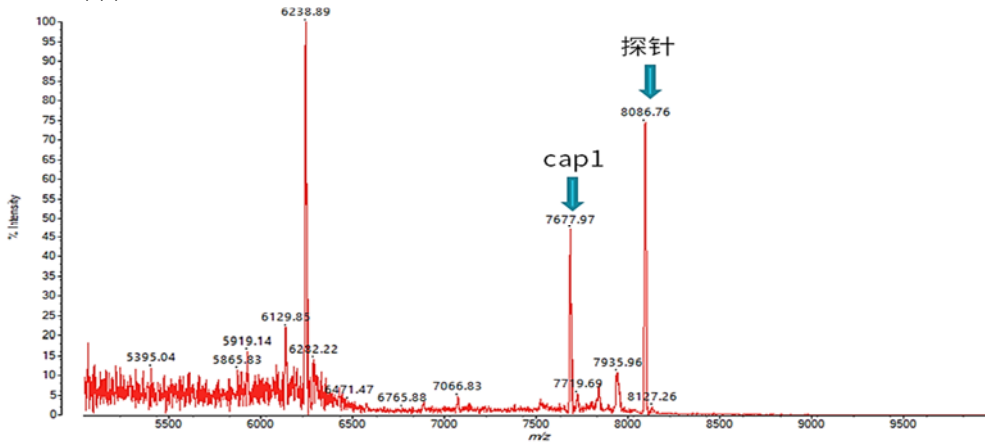


图 1. mRNA 样品 1 质谱图

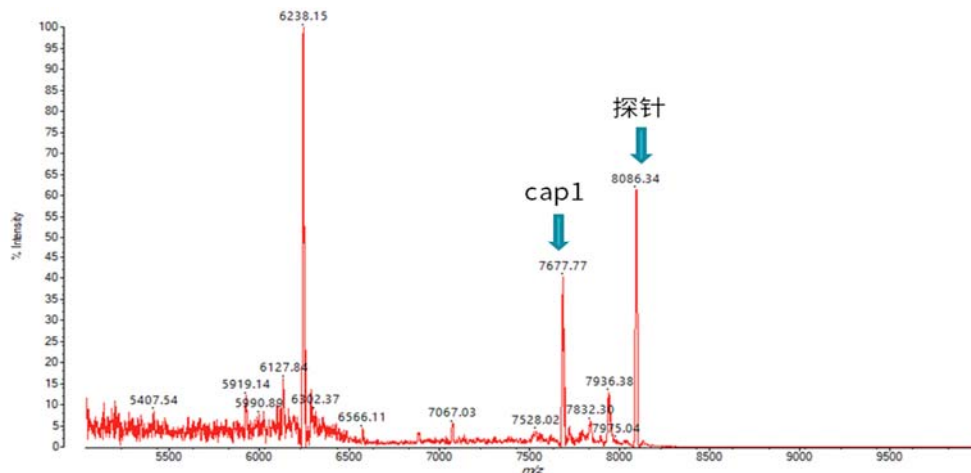


图 2. mRNA 样品 2 质谱图

3. 结论

本文应用台式基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱 MALDI-8020 对共转录加帽后的 mRNA 样品进行帽子端的分析,可直接检测到样品中帽子的形式及相对含量。本方法操作简单、检测成本低、分析速度快,结果直接、准确、可靠,有望在 mRNA 药物和疫苗生产质控方面有更加广泛的应用。

应用 MALDI-8030 负离子模式对 mRNA 酶法加帽反应产物进行定性分析

摘要: 本文使用岛津双极性台式基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱MALDI-8030对酶法加帽反应后mRNA加帽产物进行质谱分析, 4个mRNA样品均成功检出目标离子峰, 并根据分子量推断出mRNA的加帽类型, 与理论相符。分析过程具有前处理流程简单、分析成本低、结果准确可靠的特点。

关键词: 基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱 MALDI-TOF mRNA 加帽

技术特点:

- ❖ 使用性价比比较高的台式 MALDI-TOF, 无需复杂前处理, 轻松实现寡核苷酸类样品的检测。
- ❖ 检测在负离子模式下进行, 减少了盐加合物产生, 谱图更简单且易于解析。

随着COVID-19在全球肆虐, mRNA疫苗和疗法成为生物医药研发领域中的“新星”。mRNA疫苗可将编码抗原的mRNA通过递送系统引入体内合成蛋白从而触发免疫应答。mRNA疗法也逐渐用于多种疾病的治疗。然而, mRNA需要递送至病患的靶向器官并有效生成蛋白质, 才能发挥功能。

为保证mRNA的递送和蛋白质的有效生成, 通常在构建体的5'端进行加上帽子结构。帽子结构, 指在真核生物中转录后修饰形成的成熟mRNA在5'端的一个特殊结构。根据甲基化程度不同可形成3种类型的帽子: CAP 0型、CAP 1型和CAP 2型。mRNA工艺生产中通常采用酶法加帽和共转录加帽2种方式进行加帽。帽子结构可以防止mRNA的降解并促进mRNA的翻译。检测mRNA加帽率是mRNA生产工艺质量分析的关键指标。

MALDI-8030是岛津MALDI家族最新型号台式机, 极性双全, 正负离子模式快速切换, 领先的负离子模式分辨率, 在核酸分析方面具有明显优势。本文应用MALDI-8030的负离子模式对酶法加帽mRNA产物进行了加帽类型定性分析, 成功检出目标离子峰并推断出mRNA产物的加帽类型。

1. 实验部分

1.1 仪器

双极性台式基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱仪 MALDI-8030。



图 1. 岛津 MALDI-8030 质谱仪

1.2 试剂与样品

基质：3-羟基-2-吡啶甲酸（3-HPA）。

样品：酶法加帽反应后的 mRNA 样品信息如表 1。

表 1. 样品信息表

样品名称	理论加帽类型
样品 1	UNCAP
样品 2	CAP 0
样品 3	CAP 1
样品 4	CAP 0 和 CAP 1

1.3 分析条件

调谐模式：线性负离子模式 激光器：355 nm 固态激光器
扫描范围：m/z 6000-10000 激光能量：80-100

1.4 样品前处理

将酶法加帽反应后的 mRNA 作为待分析的样品溶液。取 1 μL 样品溶液点样到靶板，自然晾干后，再取 1 μL 3-HPA（3-羟基-2-吡啶甲酸）基质溶液（浓度为 40 mg/mL）覆盖在样品上，自然晾干后将靶板送入仪器分析。

2. 结果与讨论

4 个 mRNA 样品包含的加帽类型有 3 种（UNCAP 型、CAP 0 型和 CAP 1 型），不同加帽类型对应的理论分子量不同，具体分子量信息如表 2。因此可根据质谱实测分子量的差异对不同的加帽类型进行区分。

表 2. 不同加帽类型的理论分子量信息

加帽类型	理论分子量	[M-H] ⁻ 理论值
UNCAP	7883.71	7882.70
CAP 0	8165.98	8164.97
CAP 1	8179.98	8178.97

使用 MALDI-8030 对 4 个 mRNA 样品进行检测，样品的质谱分析结果汇总如表 3。质谱图见图 2-图 5。样品 1 检测到目标离子峰 m/z 7882.25，对应表 2 中 UNCAP 型的 [M-H]⁻ 离子峰。样品 2 检测到目标离子峰 m/z 8164.89，对应表 2 中 CAP 0 型的 [M-H]⁻ 离子峰。样品 3 检测到目标离子峰 m/z 8178.35，对应表 2 中 CAP 1 型的 [M-H]⁻ 离子峰。样品 4 检测到 2 个目标离子峰 m/z 8164.86 和 m/z 8178.64，分别对应表 2 中 CAP 0 型和 CAP 1 型的 [M-H]⁻ 离子峰。4 个样品加帽类型分析结果均与理论值（表 1）相符。

此外，样品 3 和样品 4 除目标峰外，还分别检测到 m/z 7807.55、m/z 7807.99 离子峰，可能为 mRNA 酶法加帽反应过程中产生的中间产物。

表 3. mRNA 样品质谱分析结果

样品名称	目标峰实测值	加帽形式推断结果
样品 1	7882.25	UNCAP
样品 2	8164.89	CAP 0
样品 3	8178.35	CAP 1
样品 4	8164.86 和 8178.64	CAP 0 和 CAP 1

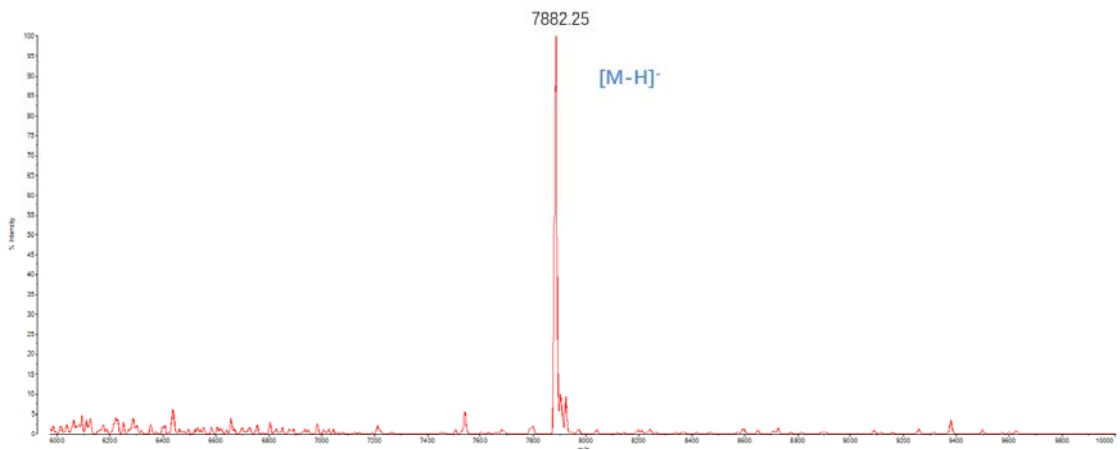


图 2. mRNA 样品 1 质谱图

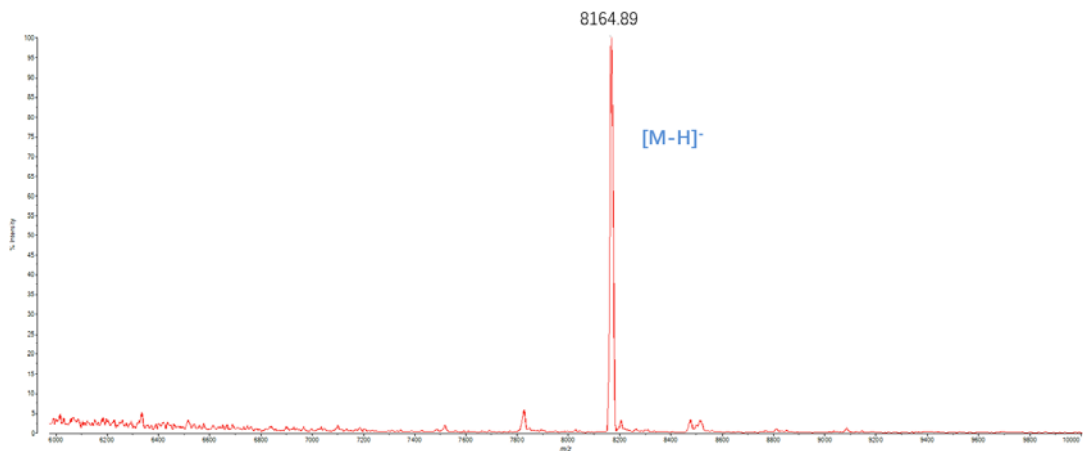


图 3. mRNA 样品 2 质谱图

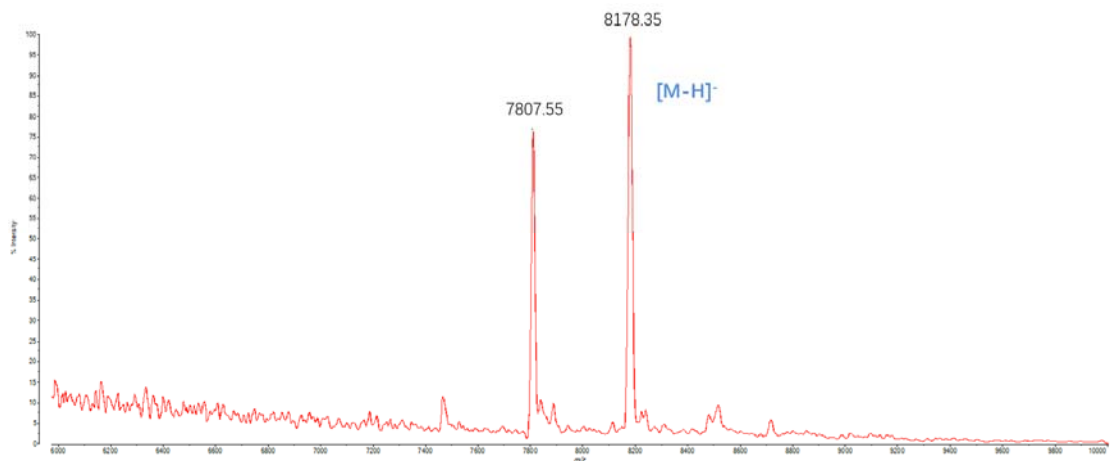


图 4. mRNA 样品 3 质谱图

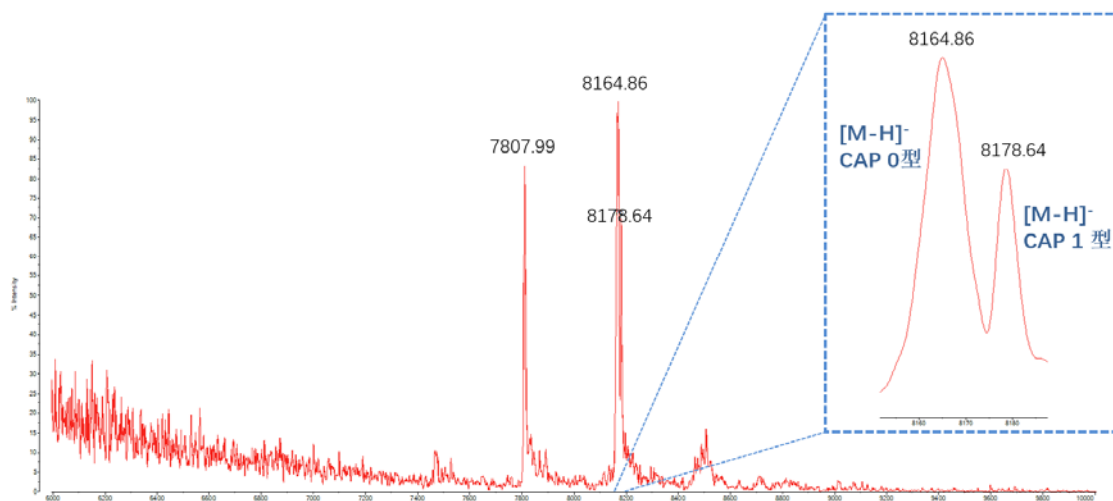


图 5. mRNA 样品 4 质谱图

3. 结论

本文使用双极性台式基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱MALDI-8030对酶法加帽反应后mRNA加帽产物进行定性分析，可直接检测到目标离子峰并根据分子量推断出mRNA加帽类型。本方法简便快捷、结果准确可靠，为mRNA生产制造过程中的加帽分析提供一种新的思路，为mRNA疫苗和mRNA药物的生产质量控制提供方法参考。

应用台式 MALDI-TOF MS 分析 mRNA 和 DNA 生产用核苷酸原料的分子量及组成

摘要：本文应用岛津台式基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱 MALDI-8020 对 mRNA 和 DNA 生产所用的 NTP 和 dNTP 原料进行质谱分析，可直接检测到核苷酸原料的分子量及组成形式。本方法操作简便、分析速度快，结果直接可靠，为 mRNA 和 DNA 生产相关原料的质量控制提供了参考。

关键词：MALDI-TOF mRNA DNA 原料 NTP dNTP

技术特点：

- ❖ 一次实验可直接检测到核苷酸原料的分子量及组成形式。
- ❖ 本方法无需复杂的样品前处理，操作简便，分析速度快，可以进行高通量检测。

mRNA和DNA生产过程中需要用到多种核苷酸类原料。例如，mRNA生产时，体外转录的直接原料为NTP (ATP、UTP、CTP、GTP)，DNA聚合酶生产DNA时的直接原料为dNTP (dATP、dTTP、dCTP、dGTP)。核苷酸原料的检测与分析是mRNA和DNA生产物料质控的重要一环。

本文应用台式MALDI-TOF质谱仪MALDI-8020对NTP、dNTP原料进行了分析，直接检测到了原料的分子量及分子组成形式。该检测方法无需复杂的样品前处理、操作简单、分析速度快，检测通量高，结果直接可靠，可作为核酸原料质控的日常检测手段。

1. 实验部分

1.1 仪器

台式基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱仪 MALDI-8020

1.2 分析条件

调谐模式	： 线性正离子模式	激光能量	： 75-80
激光器	： 355 nm 固态激光器	离子门阈值	： 300
扫描范围	： m/z 300-2000	脉冲引出质量(Da)	： 1500

1.3 样品前处理

取样品加水稀释为100 μM，作为样品工作液。吸取0.5 μL NaTFA溶液 (1 mg/mL)、11 μL DHB基质溶液 (30 mg/mL)、0.5 μL 样品工作液依次点靶，自然干燥后将靶板送入质谱分析。

2. 结果与讨论

2.1 mRNA 体外转录原料 NTP 分子量及组成分析

应用 MALDI-8020 对 mRNA 体外转录原料 ATP、GTP、CTP、UTP 进行检测，结果见图 2，核苷酸的分子式、理论分子量、实测分子量见表 1。以图 2A 为例，ATP 检测到 m/z 530.12、m/z 552.16、m/z 574.13、

m/z 596.11 的离子峰，依次对应 ATP 的 $[M+Na]^+$ 、 $[M+2Na-H]^+$ 、 $[M+3Na-2H]^+$ 以及 $[M+4Na-3H]^+$ 的化合物形式^[1,2]，可能为 ATP 中三磷酸基团上 H 离子被 Na 离子部分或全部取代后的产物。同样地，GTP、CTP、UTP 也依次检测到了结合 1-4 个 Na 离子的化合物离子形式，结果见表 1 及图 2。除核苷酸目标峰外，样品还检测到基质背景峰，如 m/z 551。

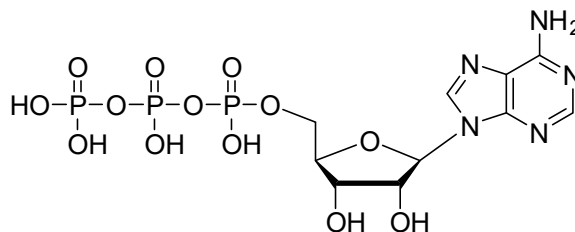


图 1. ATP (三磷酸腺苷) 结构式 (核苷酸结构式示例)

表1. NTP分子式及分子量检测结果

名称	分子式	$[M+Na]^+_{mono}$		$[M+2Na-H]^+_{mono}$		$[M+3Na-2H]^+_{mono}$		$[M+4Na-3H]^+_{mono}$	
		理论值	实测值	理论值	实测值	理论值	实测值	理论值	实测值
ATP	$C_{10}H_{16}N_5O_{13}P_3$	529.99	530.12	551.97	552.16	573.95	574.13	595.93	596.11
GTP	$C_{10}H_{16}N_5O_{14}P_3$	545.98	546.15	567.96	568.10	589.94	590.08	611.93	612.05
CTP	$C_9H_{16}N_3O_{14}P_3$	505.97	506.12	527.96	527.94	549.94	549.83	571.92	571.88
UTP	$C_9H_{15}N_2O_{15}P_3$	506.96	507.02	528.94	528.85	550.92	550.93	572.90	--

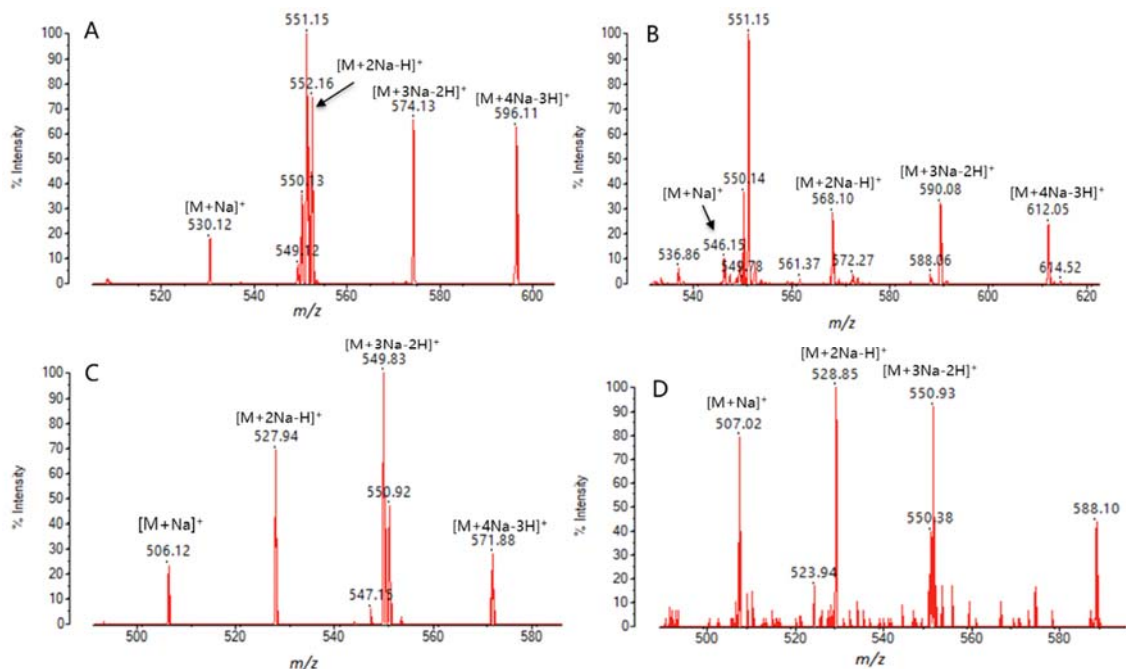


图 2.RNA 药物生产原料 NTP 一级质谱图 (A: ATP, B: GTP, C: CTP, D: UTP)

注：m/z 551 为基质背景峰

2.2 聚合酶链式反应生产 DNA 药物原料 dNTP 分子量及分析

应用 MALDI-8020 对聚合酶链式反应生产 DNA 药物原料 dATP、dGTP、dCTP、dTTP 进行检测，结果见图 3。如图 3A 所示，dATP 检测到 m/z 514.16、m/z 536.04、m/z 558.03、m/z 579.99 的离子峰，依次对应 dATP 的 $[M+Na]^+$ 、 $[M+2Na-H]^+$ 、 $[M+3Na-2H]^+$ 以及 $[M+4Na-3H]^+$ 的化合物形式，可能为 dATP 中三磷酸

基团上 H 离子被 Na 离子部分或全部取代后的产物。同样地, dGTP、dCTP、dTTP 也依次检测到了结合 1-4 个 Na 离子的化合物离子形式, 结果见表 2 及图 3。

表2. dNTP分子式及分子量检测结果

名称	分子式	[M+Na] ⁺ _{mono}		[M+2Na-H] ⁺ _{mono}		[M+3Na-2H] ⁺ _{mono}		[M+4Na-3H] ⁺ _{mono}	
		理论值	实测值	理论值	实测值	理论值	实测值	理论值	实测值
dATP	C ₁₀ H ₁₆ N ₅ O ₁₂ P ₃	513.99	514.16	535.97	536.04	557.95	558.03	579.94	579.99
dGTP	C ₁₀ H ₁₆ N ₅ O ₁₃ P ₃	529.99	530.08	551.97	552.09	573.95	574.04	595.93	596.04
dCTP	C ₉ H ₁₆ N ₃ O ₁₃ P ₃	489.98	489.98	511.96	511.98	533.94	533.90	555.93	555.95
dTTP	C ₁₀ H ₁₇ N ₂ O ₁₄ P ₃	504.98	505.23	526.96	526.98	548.94	548.91	570.92	570.95

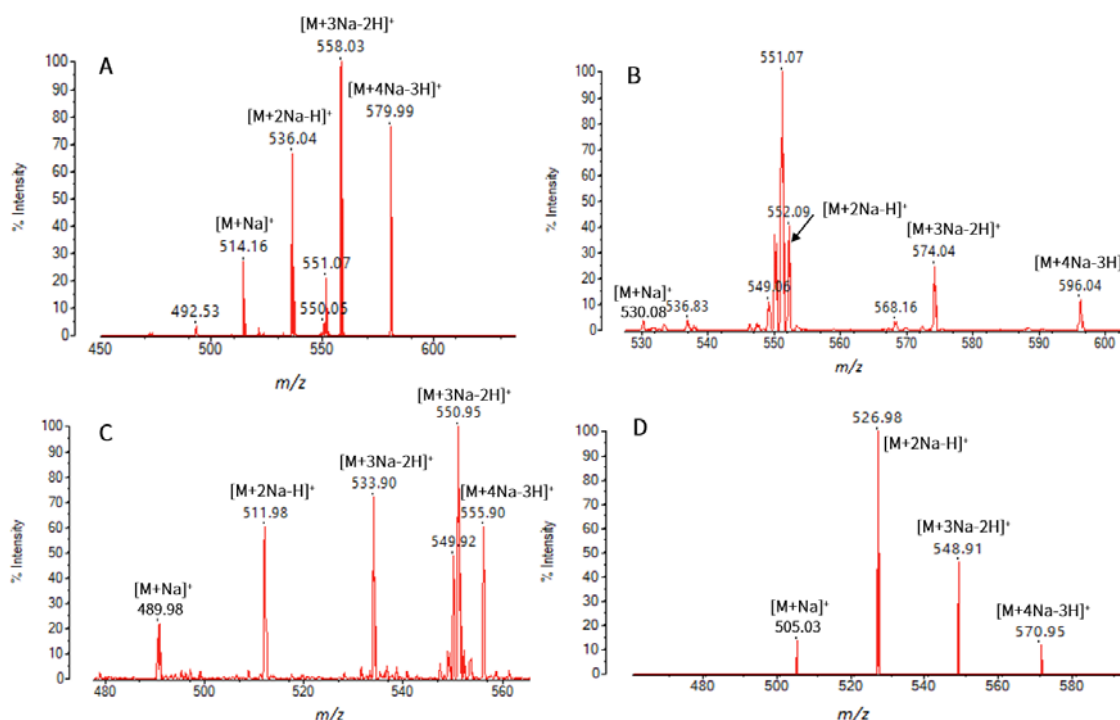


图 3. DNA 药物生产原料 dNTP 一级质谱图(A: dATP, B: dGTP, C: dCTP, D: dTTP)

注: m/z 551 为基质背景峰

3. 结论

本文应用台式基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱 MALDI-8020 对 mRNA 体外转录原料 NTP 以及 DNA 原料 dNTP 进了分析, 所有原料均检测到了显著的加钠峰, 可以对结果进行快速确证。本方法操作简单、检测成本低、分析速度快, 结果直接、准确、可靠, 有望在 mRNA 体外转录原料和 DNA 原料质控方面有更加广泛的应用。

[参考文献]

- Eric Largy, Alexander König, Anirban Ghosh, Debasmita Ghosh, Sanae Benabou, Frédéric Rosu, and Valérie Gabelica. Mass Spectrometry of Nucleic Acid Noncovalent Complexes. Chemical Reviews. 2022, 122, 7720-7839
- Noah P. Christian, Steven M. Colby, Lori Giver, Chris T. Houston, Randy J. Arnold, Andrew D. Ellington and James P. Reilly.

High Resolution Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-flight Analysis of Single-stranded DNA of 27 to 68 Nucleotides in Length. RAPID COMMUNICATIONS IN MASS SPECTROMETRY, 1995, VOL. 9,1061-1066

应用台式 MALDI-TOF MS 分析 mRNA 药物及疫苗生产所用核酸原料的分子量及组成

摘要: 本文应用岛津台式基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱 MALDI-8020 对 mRNA 药物及疫苗生产所用的核酸原料进行质谱分析,可直接检测到 mRNA 体外转录 UTP 原料及共转录加帽反应中帽子类似物的分子量及组成形式。本方法操作简便、分析速度快,结果直接可靠,为 mRNA 药物及疫苗生产相关原料的质量控制提供了参考。

关键词: 基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱 MALDI-TOF mRNA 原料 UTP

mRNA 药物及疫苗生产过程需要用到多种原料,其中用于 mRNA 体外转录与修饰(加帽、加尾)环节的原料对保证 mRNA 的质量及有效性至关重要。mRNA 体外转录的直接原料为 NTP (ATP、UTP、CTP、GTP),加帽加尾由于采用的修饰路线不同原料有所不同。本文应用台式 MALDI-TOF 质谱仪 MALDI-8020 对 UTP 原料及共转录加帽反应中的帽子类似物原料进行了分析,直接检测到了原料的分子量及分子组成形式。该检测方法操作简单、分析速度快,结果直接可靠,可作为 mRNA 体外转录和修饰原料质控的日常检测手段。

1. 实验部分

1.1 仪器

台式基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱仪 MALDI-8020

1.2 分析条件

调谐模式	: 线性正离子模式	激光器	: 355 nm 固态激光器
扫描范围	: m/z 200-5000	激光能量	: 65~85

1.3 样品前处理

吸取 1 μ L 样品溶液和 1 μ L 基质溶液 (35 mg/mL 3-HPA / 4 mg/mL CHCA) 依次点靶,自然干燥后将靶板送入质谱分析。

2. 结果与讨论

2.1 mRNA 体外转录原料 UTP 分子量分析

应用 MALDI-8020 对 mRNA 体外转录原料 UTP (分子式为 $C_9H_{15}N_2O_{15}P_3$) 进行检测,结果见图 1。由质谱图可见,样品检测到质荷比为 m/z 485.17 的离子峰,对应为 UTP 的加氢峰 ($[M+H]^+$, 理论值为 m/z 484.98)。另外,样品中还检测到 m/z 507.27、m/z 523.24 的离子峰,分别对应 UTP 的钠离子加合峰 ($[M+Na]^+$) 以及钾离子加合峰 ($[M+K]^+$)。由于基质在 m/z 500 附近存在背景干扰,除 UTP 目标峰外,质谱图中还检测到一系列背景峰,空白基质的质谱图见图 2。

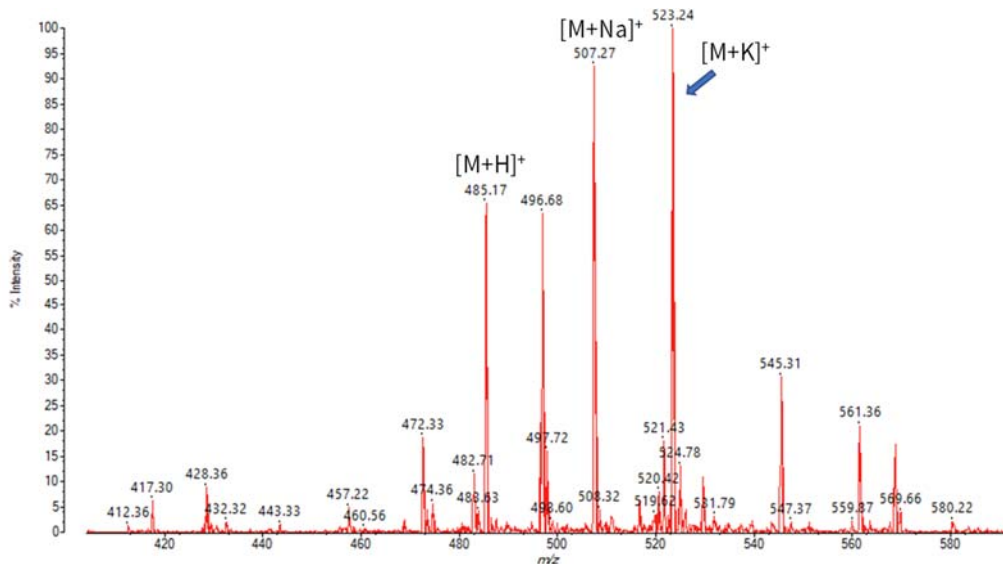


图 1. mRNA 合成原料 UTP 的质谱图

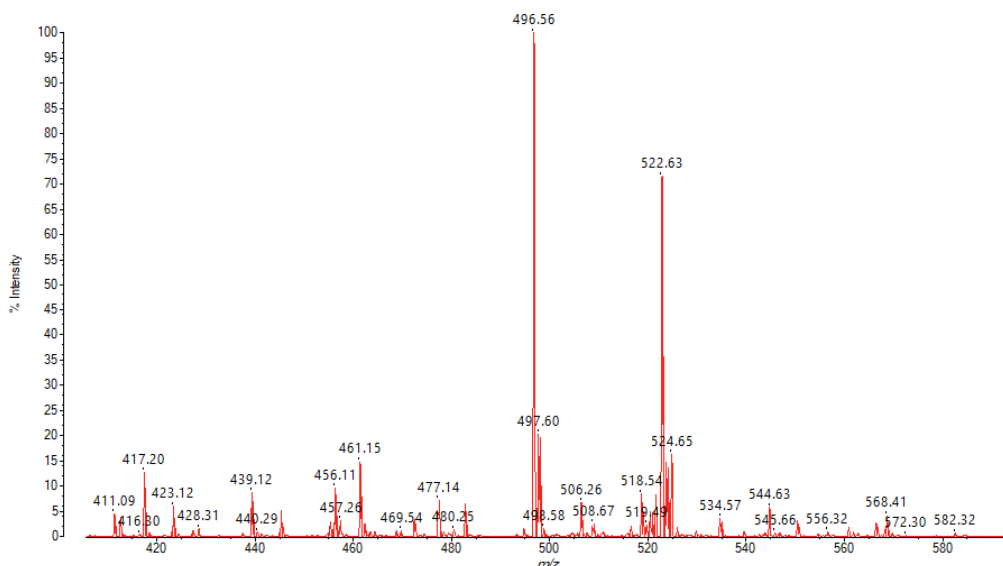


图 2. 空白基质质谱图

2.2 mRNA 加帽原料帽子类似物的分子量分析

应用 MALDI-8020 对某共转录加帽反应中的帽子类似物 EZ Cap™ Reagent AG (分子式为 $C_{32}H_{43}N_{15}O_{24}P_4$) 进行检测, 观测到质荷比为 m/z 1146.29 的离子峰, 为帽子类似物的加氢峰 ($[M+H]^+$) (理论值为 m/z 1146.16)。将 m/z 1146 附近区域进行局部放大, 还可看到 m/z 1168.47 与 m/z 1184.6 的离子峰, 分别对应帽子类似物的钠离子加合峰与钾离子加合峰。除帽子单体外, 质谱图中还检测到样品中存在二聚体 ($[2M+H]^+$) 甚至三聚体形式 ($[3M+H]^+$) (图 3)。

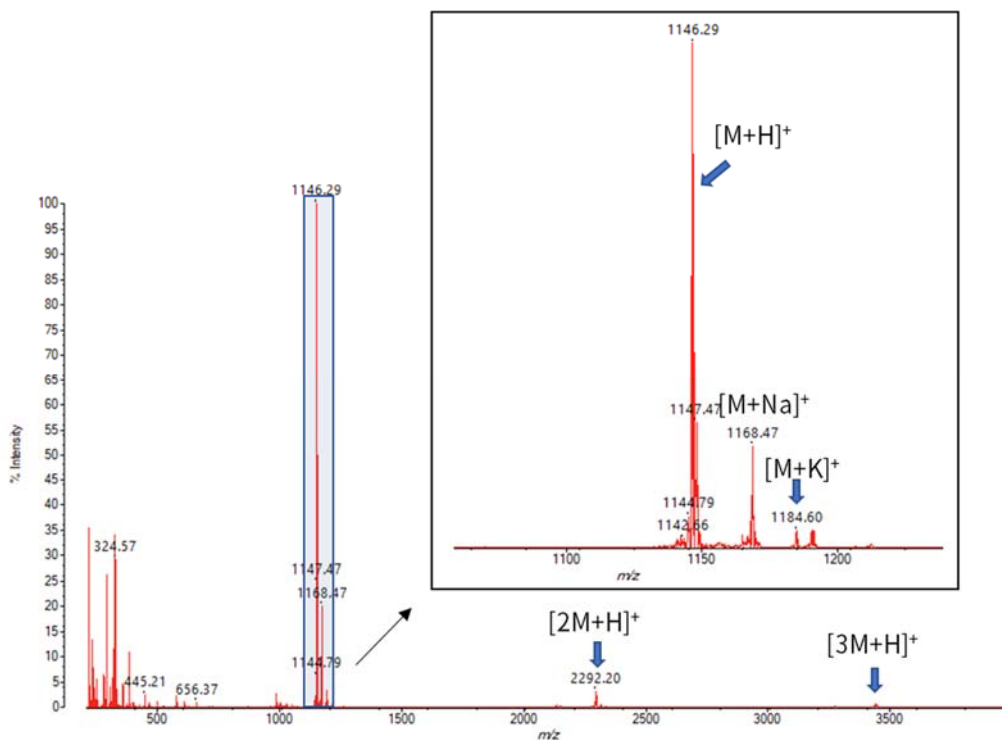


图 3. mRNA 加帽原料帽子类似物的质谱图

3. 结论

本文应用台式基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱 MALDI-8020 对 mRNA 体外转录原料 UTP 以及 mRNA 加帽原料帽子类似物进行了分析，UTP 检测到了显著的加氢峰、加钠峰、加钾峰，帽子原料检测到了显著的氢离子加合峰以及少量的二聚体、三聚体的离子峰。本方法操作简单、检测成本低、分析速度快，结果直接、准确、可靠，有望在 mRNA 合成核酸原料质控方面有更加广泛的应用。

通过抑制金属吸附提高核苷酸分析重现性和定量准确性

摘要: 本文介绍了结合“无金属流路”的生物惰性超高效液相色谱仪“Nexera XS inert”系统和在不锈钢色谱柱内表面包覆有 PEEK 材料的“无金属色谱柱”，在核苷酸样品分析中的应用。与金属流路系统相比，此系统在分析核苷酸等具有磷酸基团的化合物时有很好的金属吸附抑制效果，可以获得良好的分析重现性和定量准确性。

关键词: 生物惰性液相色谱 Nexera XS inert 核苷酸 抑制金属吸附

通常用于HPLC流路管线的不锈钢兼具优异的耐压性、耐腐蚀性，但由于是金属，会与具有磷酸基团的化合物产生相互作用，经常引起峰形变差和强度降低。为抑制此金属吸附，会使用磷酸等进行流路清洗、添加螯合剂、使用高浓度样品进行掩盖。但是，即使采取此类处理方式，仍难以获得高重现性的分析结果。

本文介绍了“无金属流路”的超高效液相色谱仪“Nexera XS inert”系统，以及在不锈钢色谱柱内表面包覆有 PEEK 材料的“无金属色谱柱”，此系统分析核苷酸等具有磷酸基团的化合物时有很好的金属吸附抑制效果。

1. 实验部分

1.1 仪器

生物惰性超高效液相色谱仪 Nexera XS inert

超高效液相色谱仪 Nexera XS

1.2 分析条件

色 谱 柱 : Shim-pack Scepter C18-120 (无金属, 100 mm × 2.1 mm I.D., 3 μm);

Shim-pack Scepter C18-120 (100 mm × 2.1 mm I.D., 3 μm)

流 动 相 : 乙腈/10 mmol/L 甲酸铵溶液 = 0.5: 99.5

流 速 : 0.2 mL/min 柱 温 : 40°C

进样体积 : 2 μL 检测波长 : 254 nm (UHPLC 惰性流通池)

1.3 样品制备

含磷酸基团的单磷酸腺苷 (AMP)、二磷酸腺苷 (ADP) 和三磷酸腺苷 (ATP)，使用超纯水溶解、稀释后制备为待测样品。为评价金属吸附的影响，我们比较色谱仪和色谱柱的两个组合方式，一个是含金属的系统，另一个是无金属系统。

2. 结果与讨论

2.1 峰形及峰面积重复性的比较

AMP、ADP、ATP 的混合标准溶液 (50 μg/mL) 色谱图如图 1 所示，重复分析 10 次混合标准溶液时的

ATP 色谱峰拖尾因子及峰面积变化如图 2 和图 3 所示。金属流路系统中，由于金属吸附，导致色谱峰出现拖尾，拖尾因子大于 4。

此外，相同样品重复分析时，ATP 的峰面积呈增加趋势。而在无金属流路中，发现峰形得到改善，拖尾因子约为 1。此外，与金属流路系统相比，从第 1 次至第 10 次的峰面积值几乎没有变化，重现性好。由此可知，使用无金属流路系统会抑制金属吸附，可以改善峰形和提高面积重现性。

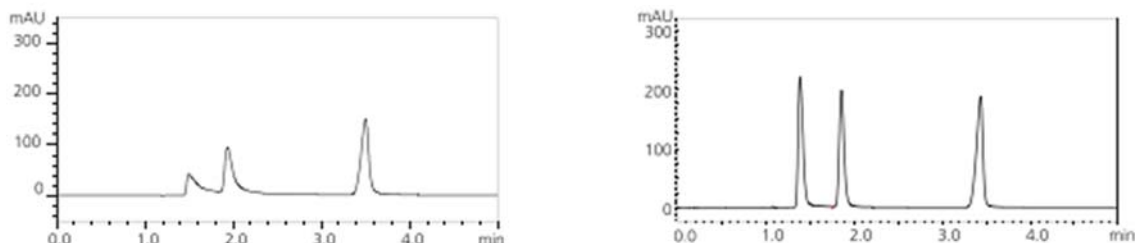


图1 AMP、ADP、ATP混合标准样品色谱图 (50 μ g/mL; 左: 金属流路; 右: 无金属流路)

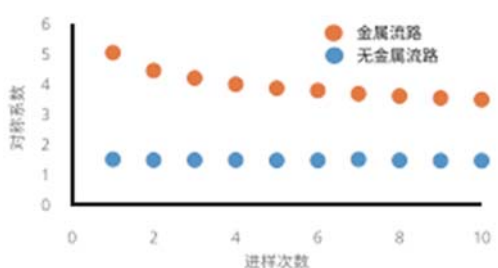


图 2 不同进样次数的 ATP 拖尾因子

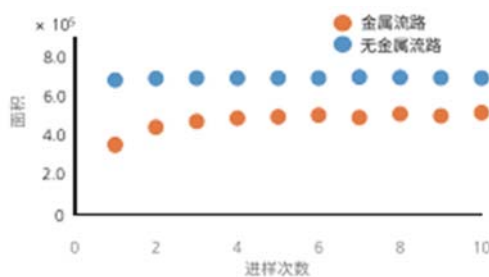


图 3 不同进样次数的 ATP 峰面积值

2.2 分析核苷酸标准样品时的定量精度比较

按照前述分析条件测定 ATP 标准溶液 (1、2.5、5、10、25、50 μ g/mL)，制作标准曲线。在金属流路系统中测定所得的标准曲线受金属吸附影响，线性降低，相关系数 $r^2=0.9918$ (图 4)。各校准点的准确度及精密度如表 1 所示。1 μ g/mL 未检出目标峰，在 2.5 μ g/mL 时得以检出，但由于峰强度不足，浓度值的偏差较大。制备了 2、20、45 μ g/mL 的样品作为 QC 样品，使用图 5 的标准曲线进行定量。定量结果、定量准确度及精密度如表 2 所示。金属流路中，由于受金属吸附的影响，特别是使用线性较差的低浓度区域标准曲线时，定量值偏差较大。

而在非金属流路系统中测定所得的标准曲线中，由于金属吸附抑制效果良好，获得了良好的线性 (相关系数 $r^2=0.9999$) (图 5)。使用无金属流路系统，在相同条件下测定 ATP 标准溶液，各校准点样品的准确度及精密度结果如表 3 所示，QC 样品的定量结果如表 4 所示。与使用金属流路系统时的结果相比，低浓度样品的准确度、精密度均获得良好结果。综合以上结果可知，流路的无金属化对于分析核苷酸等具有磷酸基团的化合物十分有效。

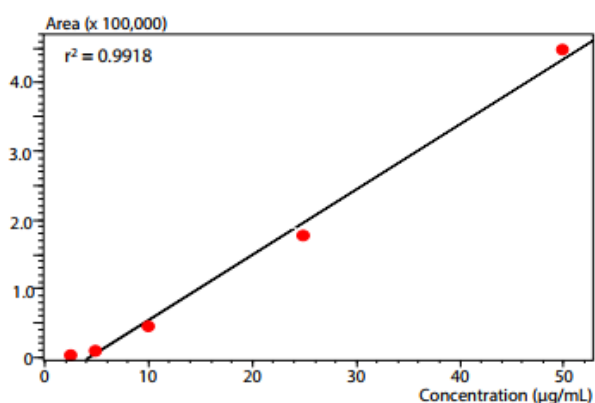


图5 ATP的标准曲线（金属流路）

表1 校准点的定量值、准确度及精密度（金属流路）

浓度(µg/mL)	定量结果		
	定量值 (µg/mL)	准确度	精密度 (n = 6)
1	N.D.*	---	---
2.5	2.28	91.0	110
5	5.29	106	4.9
10	8.65	86.5	7.1
25	22.7	91.0	6.3
50	51.3	103	3.6

*N.D.: 未检出

表2 QC样品的定量结果、准确度及精密度（金属流路）

浓度(µg/mL)	定量结果		
	定量值 (µg/mL)	准确度	精密度 (n = 6)
2	4.53	226	1.6
20	18.4	91.9	5.7
45	46.4	103	3.3

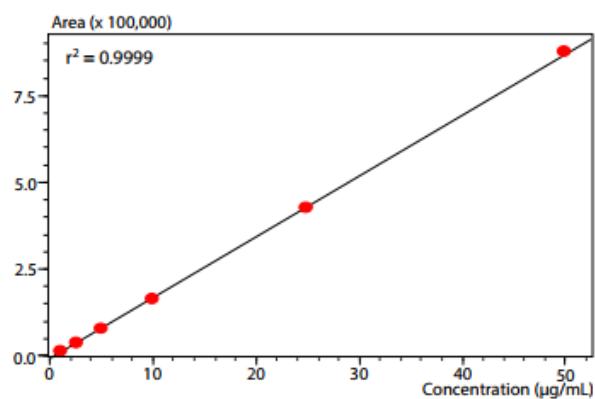


图6 ATP的标准曲线（无金属流路）

表3 校准点的定量值、准确度及精密度（无金属流路）

浓度(µg/mL)	定量结果		
	定量值 (µg/mL)	准确度	精密度 (n = 6)
1	1.07	101	0.61
2.5	2.43	97.0	0.50
5	4.82	96.4	0.28
10	9.74	97.4	0.24
25	24.9	99.4	0.81
50	50.6	101	0.095

表4 QC样品的定量结果、准确度及精密度（无金属流路）

浓度(µg/mL)	定量结果		
	定量值 (µg/mL)	准确度	精密度 (n = 6)
2	2.00	100	0.59
20	19.6	98.2	0.081
45	44.9	99.7	0.11

3. 结论

本文评价了金属吸附对核苷酸分析的影响。与使用不锈钢材质的系统、色谱柱相比，将流路无金属化，可在分析具有磷酸基团的化合物时，获得准确且重现性良好的结果。以往使用不锈钢材质系统和色谱柱分析具有磷酸基团的化合物时，需要采取抑制金属吸附的处理，而 Nexera XS inert 与 Shim-pack Scepter C18 无金属色谱柱结合使用后，无需进行金属抑制处理，即可实现高灵敏度、高精度分析。

使用生物惰性液相评价 mRNA 疫苗分析方法重复性与残留量

摘要：本文使用岛津生物惰性液相色谱系统 Nexera XS inert 结合反向离子交换色谱法建立 mRNA 疫苗检测方法。通过对 mRNA 疫苗分析方案重复性与残留量进行考察，验证得出，该方法无需进行吸附饱和与金属抑制，即可获得可靠、稳定的检测结果，极大程度节约样品消耗量、提高检测效率。

关键词：生物惰性液相 mRNA 疫苗 重复性 残留量

技术特点：

- ❖ 无需吸附饱和，即可获得重复性较好的检测结果。
- ❖ 该系统无金属管路，可有效抑制 mRNA 疫苗金属吸附，减少系统残留。

mRNA 疫苗是基于靶点或抗原的选择而对 mRNA 进行编码，并通过特定递送系统（如 LNP）进入细胞质内，在细胞内产生特定的蛋白物质，在细胞内或分泌到细胞外后，刺激免疫系统，产生免疫反应。自 1996 年开展首个 mRNA 肿瘤疫苗应用研究后，mRNA 疫苗的研发随着医药技术的发展而不断深入。2020 年出现新冠疫情，mRNA 疫苗更是被推上生物医药领域的研发热潮。在 mRNA 疫苗的研究中，液相是常用的检测分析手段。由于结构本身含有的磷酸基团，使用常规液相分析，非常容易与金属管路产生吸附，造成重复性差、残留量高、无法准确定量分析等问题。因此，解决吸附现象、获得稳定结果，成为 mRNA 疫苗液相分析中的突破重点。

目前，为应对该项难点，多数实验检测前，使用高浓度 mRNA 疫苗样品连续多针进样，对管路吸附饱和和处理，待峰面积稳定后，再进行正式数据采集；另外，进样针处的残留，还需要额外考察和优化。采用这种常规应对方法，既浪费珍贵的 mRNA 疫苗样品，又耗时，并且进样针的残留控制也并不理想。

岛津生物惰性液相 Nexera XS inert 系统，采用无金属样品流路，在耐高压的同时，具有优异的抗吸附能力。可解决 mRNA 疫苗液相分析中吸附残留等难点，本实验使用该套系统开发 mRNA 疫苗检测分析方法，无需饱和吸附、额外清洗，即可获得稳定、高效、低残留检测结果。

1. 实验部分

1.1 仪器

岛津生物惰性液相 Nexera XS inert 系统，配置信息如下：

系统控制器	: CBM-40A	脱气机	: DGU-405
输液泵	: LC-40D XSi×2	柱温箱	: CTO-40C
自动进样器	: SIL-40C XSi	检测器	: SPD-M40
色谱工作站	: Labsolutions Ver. 5.113		

1.2 分析条件

液相色谱条件：

色 谱 柱 : DNAPac™RP (100 mm x 2.1 mm I.D., 4 μm)
 流 动 相 : A-0.1 mol/L 三乙基乙酸铵: 异丙醇 (900:22.5, v:v) ;
 B-0.1 mol/L 三乙基乙酸铵: 乙腈: 异丙醇 (600:200:20, v:v:v)
 流 速 : 0.2 mL/min
 柱 温 : 60°C 进 样 体 积 : 10 μL
 洗 脱 方 式 : 梯度洗脱, B 相起始浓度为 29%, 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
5.00	泵	B Conc	29
5.10	泵	B Conc	42
18.00	泵	B Conc	42
18.10	泵	B Conc	100
21.00	泵	B Conc	100
21.10	泵	B Conc	29
30.00	控制器	STOP	

1.3 样品前处理方法

移取 mRNA 疫苗供试品 10 μL, 置 1 mL 离心管中, 加无核酸酶水 490 μL, 混匀, 待测。

2. 结果与讨论

2.1 mRNA疫苗典型色谱图

使用上述液相条件, 对某 mRNA 疫苗进行检测分析, 所得色谱图见图 1。

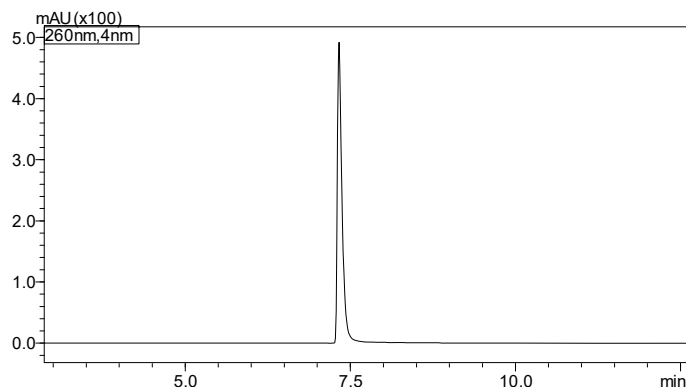


图 1 某 mRNA 疫苗色谱图 (30 μg/mL)

2.2 重复性

使用 Nexera XS inert 系统对某 mRNA 疫苗供试品无饱和操作, 直接平行进样六次, 进行重复性考察, 实验结果见表 2。

表 2. 某 mRNA 疫苗 HPLC 重复性分析结果 (n=6)

#	保留时间 (min)	峰高	峰面积
1	7.33	492,149	2,515,237
2	7.32	492,878	2,519,795
3	7.32	496,326	2,510,582
4	7.32	495,672	2,512,371
5	7.31	494,967	2,474,948
6	7.32	508,743	2,560,677
RSD%	0.08	1.22	1.09

2.2 重复性

分别使用常规液相与生物惰性液相连续分析某 mRNA 疫苗样品 7 针后, 再连续分析 3 针空白溶剂, 从而评估两套系统某 mRNA 疫苗残留量。实验结果得出, 常规液相所得三针溶剂空白残留量依次为 1.16%、0.70%、0.50%; 生物惰性液相所得三针溶剂空白残留量依次为 0.69%、0.43%、0.28%, 均小于 1%, 相比普通液相可获得更低残留量, 满足 mRNA 疫苗定量分析需求。由此可见, 岛津生物惰性液相系统使用无金属流路系统可抑制金属吸附。

Data	数据文件名	保留时间	面积	分析日期/时间
1	mRNA_1.lcd	9.078	2,456,359	2022/12/15 18:11:46
2	mRNA_2.lcd	9.087	2,452,590	2022/12/15 18:42:19
3	mRNA_3.lcd	9.074	2,472,244	2022/12/15 19:12:53
4	mRNA_4.lcd	9.076	2,476,765	2022/12/15 19:43:26
5	mRNA_5.lcd	9.078	2,483,765	2022/12/15 20:14:00
6	mRNA_6.lcd	9.086	2,507,533	2022/12/15 20:44:34
7	mRNA_7.lcd	9.075	2,522,466	2022/12/15 21:15:07
8	第一针溶剂空白_1	9.077	29,269	2022/12/15 21:45:41
9	第二针溶剂空白_2	9.079	17,542	2022/12/15 22:16:15
10	第三针溶剂空白_3	9.083	12,607	2022/12/15 22:46:49

图 2. 某 mRNA 疫苗残留量考察结果 (常规液相)

Data	数据文件名	保留时间	面积	分析日期/时间
1	溶剂空白.lcd	—	—	2022/12/29 13:24:56
2	mRNA-01.lcd	7.327	2,515,237	2022/12/29 13:55:21
3	mRNA-02.lcd	7.320	2,519,795	2022/12/29 14:25:45
4	mRNA-03.lcd	7.319	2,510,582	2022/12/29 14:56:10
5	mRNA-04.lcd	7.319	2,512,371	2022/12/29 15:26:34
6	mRNA-05.lcd	7.309	2,474,948	2022/12/29 15:57:00
7	mRNA-06.lcd	7.317	2,560,677	2022/12/29 16:06:34
8	mRNA-07.lcd	7.317	2,543,999	2022/12/29 16:36:59
9	第一针溶剂空白.lcd	7.320	17,554	2022/12/29 17:07:26
10	第二针溶剂空白.lcd	7.308	10,818	2022/12/29 17:37:51
11	第三针溶剂空白.lcd	7.310	7,204	2022/12/29 18:08:16

图 3. 某 mRNA 疫苗残留量考察结果 (生物惰性液相)

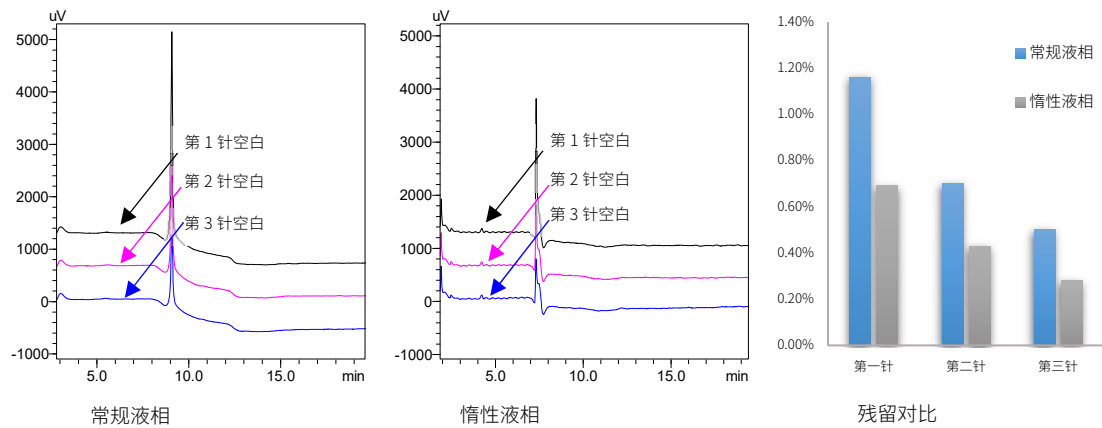


图 4 某 mRNA 疫苗残留量考察色谱图

3. 结论

实验使用岛津 Nexera XS inert 生物惰性超高效液相建立 mRNA 疫苗样品分析方法。通过考察重复性与残留量可知，该系统在无预饱和处理，直接进样分析后，目标物保留时间、峰面积 RSD%分别为 0.08%、1.09%；检测完成后，无额外残留处理，三针空白溶剂的残留量分别为 0.69%、0.43%、0.28%。所得结果，满足 mRNA 疫苗重复性与残留量检测需求。

17.00	Pumps	Pump B Conc.	95
20.00	Pumps	Pump B Conc.	95
21.00	Pumps	Pump B Conc.	20
25.00	Controller	Stop	

1.3 样品前处理方法

称取适量样品以纯水溶解，配制浓度为 1 pM 溶液，待测。

2. 结果与讨论

2.1 空白溶剂色谱图

将纯水进行分析，色谱图显示，基线无干扰峰。

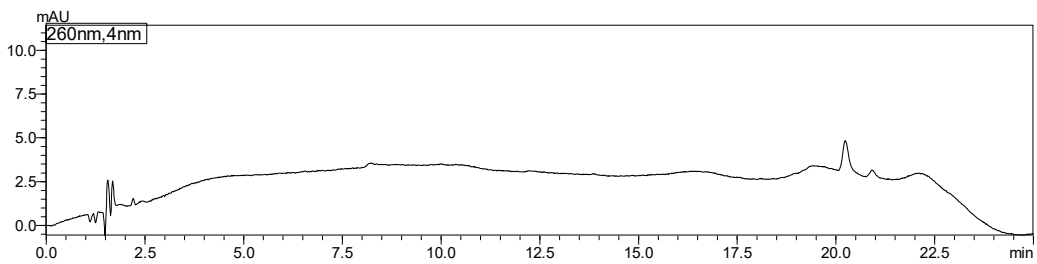


图 1 空白溶剂

2.2 Sample1样品纯度分析

sample1 中主成分是约 4kb mRNA, 分子量约 1300k Da, 在上述分析条件下, 主峰保留时间 8.085 min, 杂质峰 1 在主峰之前出峰, 保留时间 6.773 min。根据面积归一法计算, sample1 纯度 99.831%。如下图 2 所示, 纯度数据如表 2 所示

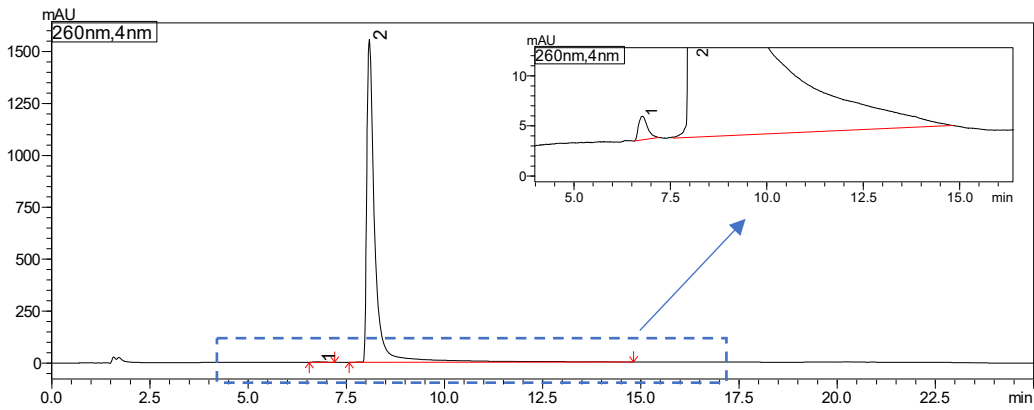


图 2 Sample1 色谱图

表 2. Sample1 峰表

ID	保留时间	面积	面积%
1	6.773	38073	0.169
2	8.085	22455533	99.831

2.3 Sample2样品纯度分析

Sample2 是在 sample1 基础上加入一定浓度的模板 DNA, 以及 BSA 蛋白。如下图 3 所示, 除主峰外,

可观测到 4 个杂质峰, 杂质峰面积, 纯度比例如下表 3 所示。根据面积归一法计算, sample2 的纯度 93.533%。

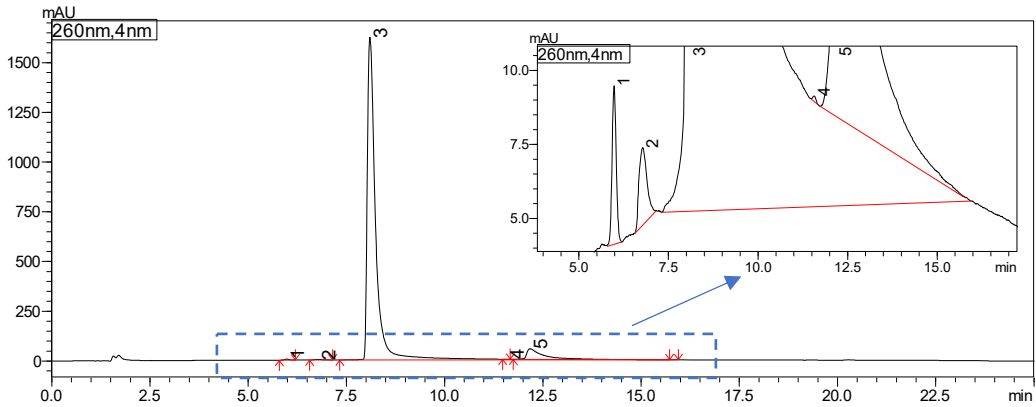


图 3 Sample2 分离色谱图

表 3. Sample2 峰表

ID	保留时间	面积	面积%
1	5.982	43168	0.165
2	6.782	40232	0.153
3	8.098	24528677	93.533
4	11.573	1090	0.004
5	12.173	1611596	6.145

2.4 Sample2 重复性实验

Sample2 重复进样 3 次, 保留时间及面积重复性如下图 4 和表 4 所示, 主峰及杂质峰的保留时间 RSD<0.07%, 面积 RSD<1.7%, 稳定性良好。

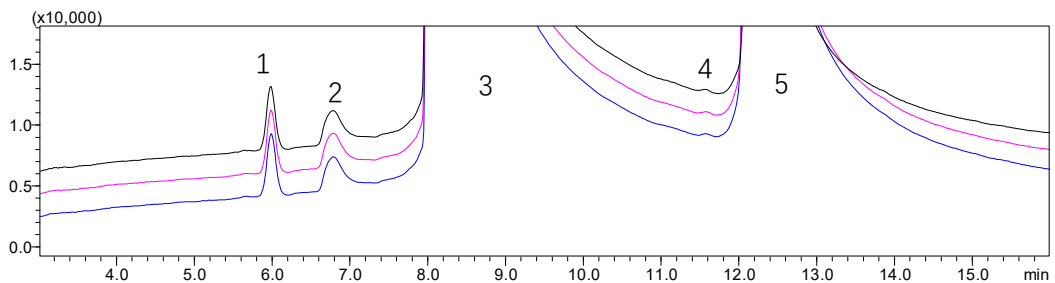


图 4 分离色谱图

表 4 Sample2 重复性分析结果 (n=2)

名称	保留时间 RSD%	面积 RSD%
1	0.06	1.02
2	0.03	0.92
3	0.06	1.67
4	0.05	1.22
5	0.02	1.69

2.5 Sample2 杂质定性

为了确认杂质的组成，制备了转录过程原料、辅料样品，包括模板 DNA，dsRNA，DnaseI 以及病毒蛋白等，通过保留时间确认，杂质峰 5 可能为 dsRNA、DNA 共溶出的色谱峰。dsRNA，DNA 样品同等条件下的色谱图如图 5 所示。

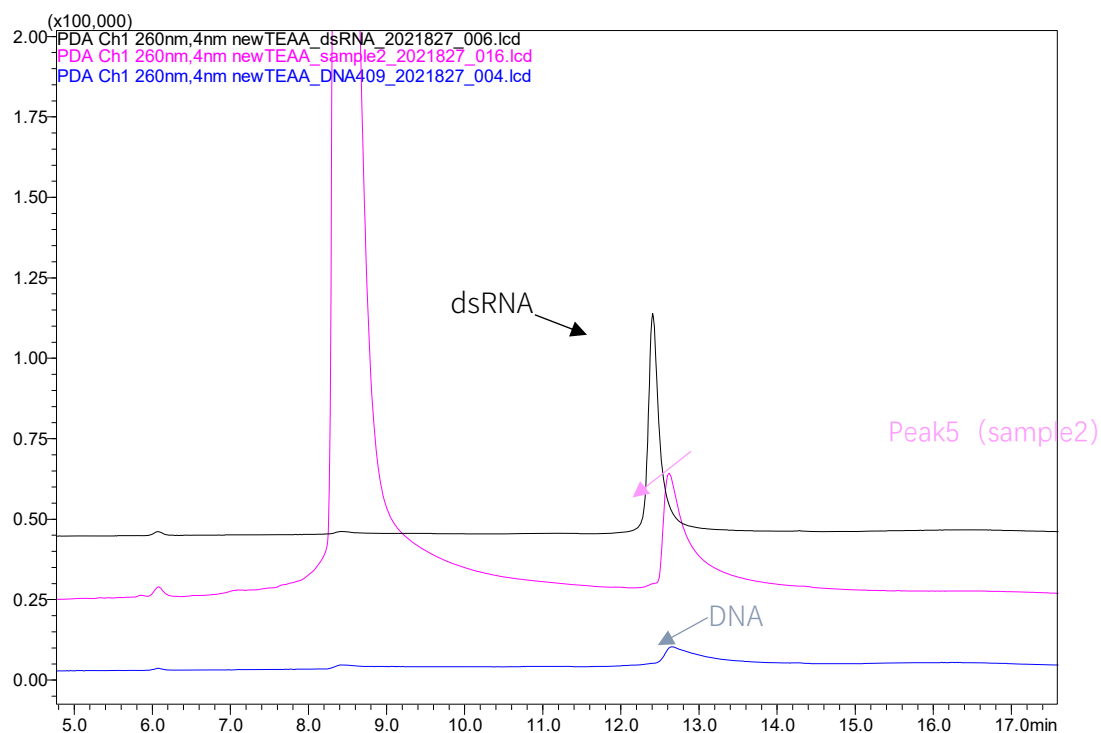


图 5 sample2 与 dsRNA，DNA 单标对比图 (ch=260nm)

3. 结论

本实验建立了一种使用岛津生物兼容液相系统 (Nexera Bio) 结合 SHIMEN Ankylo C18-300S 色谱柱进行大分子核酸样品的纯度分析方法。空白溶剂无干扰，反相条件下，mRNA 与 DNA、dsRNA 分离良好。方法简单，适用于 mRNA 疫苗原料的质量控制。

扫描探针显微镜(SPM)表征 mRNA 疫苗样品的表面形貌

摘要: mRNA 疫苗是将含有编码抗原蛋白的 mRNA 导入人体, 直接进行翻译形成相应的抗原蛋白, 从而诱导机体产生特异性免疫应答, 达到预防免疫的作用。由于其具有快速研发、快速制备、持续时间长及安全性和有效性好的优点, 受到了科研工作者的重点关注。本文采用岛津扫描探针显微镜 (SPM) 技术对 mRNA 疫苗样品的表面形貌进行表征, 从而为 mRNA 疫苗制备过程的优化提供了一定的数据支持。

关键词: 扫描探针显微镜 SPM mRNA 疫苗 表面形貌

新冠病毒肺炎自爆发以来, 这场全球性的大灾难, 特大疫情, 摧毁了很多家园, 夺走了大量生命, 改变了人们的出行和生活方式。近期, 新冠病毒南非变种——奥密克戎更是来势汹汹。全世界的科学家们为了抵御这次新冠疫情, 研究出了各种技术路线的新冠疫苗, 包括: 灭活疫苗、腺病毒载体疫苗以及 mRNA 疫苗。其中, 由于 mRNA 疫苗 具有制造方便、研究迅速、安全性和有效性好、持续时间长等特点, 一直备受科学家们瞩目, 国内外各大药企也在积极进行新冠 mRNA 疫苗的研究, 并取得了较大进展。

本文借助扫描探针显微镜 (SPM) 观测了 mRNA 疫苗样品的表面形貌, 为 mRNA 疫苗制备过程的优化提供了一定的数据支持。

1. 实验部分

1.1 仪器

岛津扫描探针显微镜 SPM-9700HT



图 1. 扫描探针显微镜 SPM-9700HT

1.2 分析条件

功能模式	: 动态模式	探针	: 弹性系数 9 N/m
像素	: 512 x 512	扫描环境	: 大气环境
扫描范围	: 0.4 μm x 0.4 μm		

1.3 样品



图 2. mRNA 疫苗样品

1.4 测试过程

- (1) 将云母片用双面胶固定在不锈钢托上，并用胶带撕去云母片的表层，待用；
- (2) 用去酶水将 mRNA 疫苗样品稀释 10 倍后，滴在云母片上，并静置 10min；
- (3) 用适量的去酶水冲洗上述样品数次，并用氩气轻吹样品以去除样品表面的水分；
- (4) 将上述处理的样品再次静置 10min 后，采用扫描探针显微镜 SPM-9700HT 进行测试。

2. 结果与讨论

随机选取所制备的 mRNA 疫苗样品的某一区域进行表面形貌扫描测试，先从大范围开始扫描寻找样品，找到目标样品后逐渐缩小测试范围至合适大小，此时扫描范围为 $0.4 \mu\text{m} \times 0.4 \mu\text{m}$ （见图 3）。由表面形貌图可以观察到 mRNA 疫苗样品的结构，其中，颜色较暗的区域表示高度较低，颜色较亮的区域表示高度较高。形貌图中剖面线 AB 上的宽度信息，可直观地读取样品的直径约 114 nm。

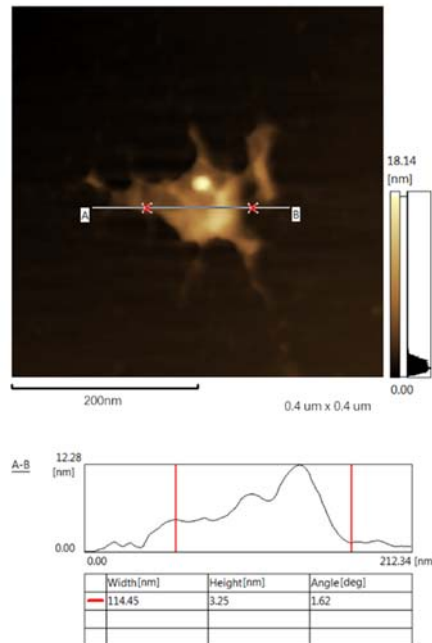


图 3. mRNA 疫苗样品的表面形貌以及剖面分析

为了更加清晰、直观地反映该 mRNA 疫苗样品的表面形貌信息，将上述获取的样品二维形貌图转换成三维形貌图（见图 4），其中高度值从低到高依次由蓝色、黄色和红色表示。

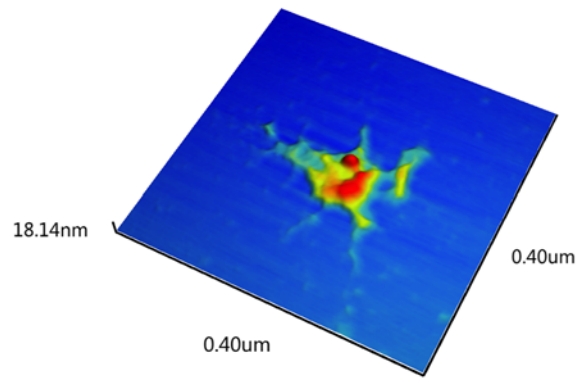


图 4. mRNA 疫苗样品的 3D 形貌

3. 总结

使用岛津扫描探针显微镜（SPM）技术，测定了 mRNA 疫苗样品的表面形貌，并使用仪器自带的软件一键将其转换成了更加清晰、直观的三维形貌图，该数据对 mRNA 疫苗样品制备过程的优化具有一定指导和参考意义。

生物惰性液相色谱分析三种构型的质粒样品

摘要：本文使用生物惰性液相色谱仪分析质粒三种构型。通过优化色谱柱温度，使3种状态质粒分离度均大于1.5，实现完全分离。质粒样品重复分析6次，保留时间RSD小于0.1%，峰面积RSD小于1.80%，重复性结果佳。此方法适用于质粒样品的分析。

关键词：生物惰性液相色谱 质粒 分离度 重复性

技术特点：

- ❖ 通过色谱柱温度优化，使3种状态质粒分离度大于1.5，实现基线分离。
- ❖ 使用惰性液相色谱仪分析质粒样品，使样品在仪器中无残留，保留时间和峰面积重复性均佳。

质粒是存在于细胞质中的一类独立于染色体的遗传因子（绝大部分为DNA）。其可以进行自主复制，并能在细胞分裂时恒定的传给子代细胞。所以，质粒作为简单易操作的基因载体，广泛用于基因细胞治疗和核酸药物领域。

标准的质粒DNA具有3种基本构型：超螺旋(Supercoiled, 简称SC)、线性(Linear)和开环(Opencircular, 简称OC)。其中超螺旋被认为是一种能够最有效地提高转染效率和目的基因表达量的质粒形态。在基因治疗的研究中更是对药用质粒的超螺旋含量做了明确要求(FDA:>80%，NMPA:≥90%，SMPA:>85%)。所以很有必要将三种质粒分离，并对其含量进行确定。

质粒为含磷酸基团的DNA，易在常规液相色谱仪中残留，从而影响分析的重复性。本文采用生物惰性液相色谱仪分析质粒样品，去除了质粒样品在仪器中的残留。同时通过方法优化，将三种构型质粒完全分离，此方法比常规的电泳法有更高的分辨率和重复性。

1. 实验部分

1.1 仪器

生物惰性超高效液相色谱仪，具体配置信息如下：

系统控制器	: CBM-40	脱气机	: DGU-405
输液泵	: LC-40D XSi×2	自动进样器	: SIL-40C XSi
柱温箱	: CTO-40C	检测器	: SPD-M40
色谱工作站	: LabSolutions Ver. 5.114		

1.2 分析条件

色谱柱	: SHIMSEN Ankylo SAX-PM (150×4.6 mm I.D., 5 μm, 岛津(上海)实验器材有限公司, P/N: 380-01215-64)		
流动相	: A相-20mM Tris-HCl(pH=8.5), B相-1M NaCl in 20mM Tris-HCl(pH=8.5)		
进样体积	: 10 μL	流速	: 1 mL/min
柱温	: 25°C	波长	: 260 nm

洗脱方式：梯度洗脱，B相初始浓度为60%，时间程序见表1。

表1. 梯度洗脱程序

Time(min)	Module	Command	Value
10.00	Pumps	Pump B Conc.	90
10.01	Pumps	Pump B Conc.	60
15	Control	Stop	

2. 结果与讨论

2.1 分离度优化

质粒有三种状态，分别为超螺旋、开环和线性，在确定了流动相和色谱柱条件后，通过调整色谱柱温度对分离度进行优化。色谱柱温度为40、30和25℃时采集得到的色谱图如图1所示，分离度结果如表2所示。结果表明，随着色谱柱温度的降低，分离度提高。温度为25℃时，分离度均大于1.5，实现完全分离。确认最终色谱柱温度为25℃。

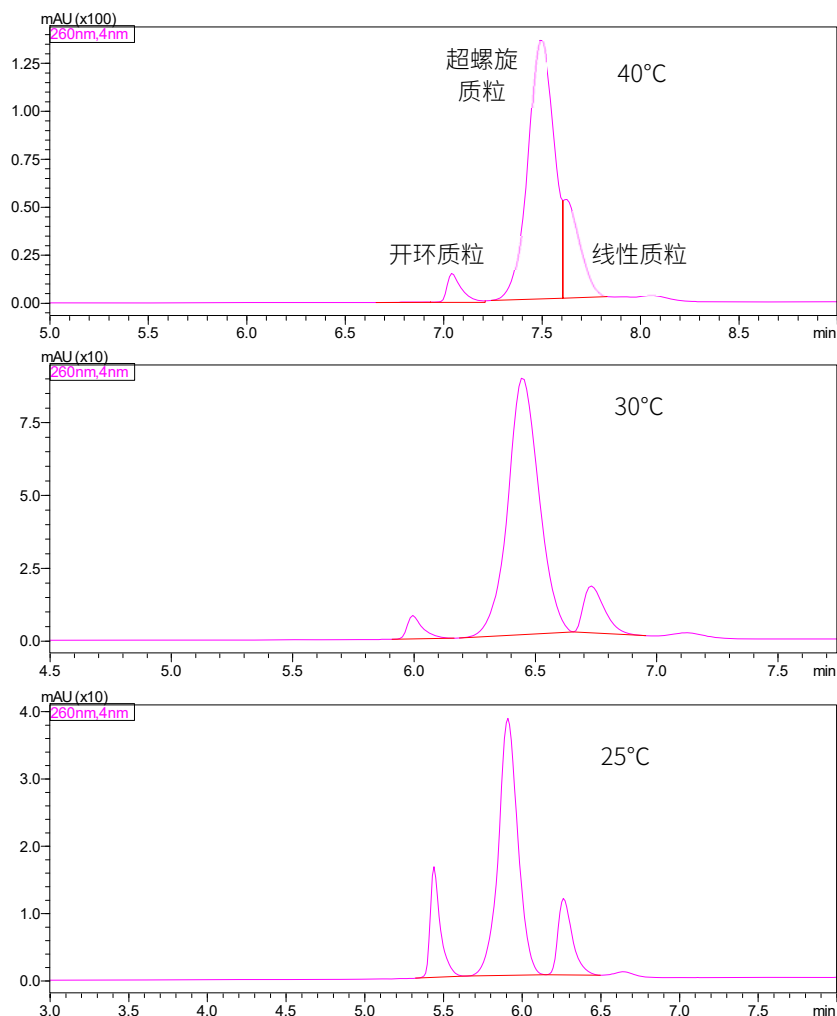


图1. 不同色谱柱温度下的色谱图

表 2. 不同色谱柱温度下三种质粒的分离度

色谱柱温度	分离度		
	开环质粒	超螺旋质粒	线性质粒
40°C	/	2.098	0.194
30°C	/	2.381	1.362
25°C	/	2.563	1.668

2.2 重复性实验结果

质粒结构中含磷酸基团，易在常规液相色谱中残留，从而影响峰面积重复性。本实验采用惰性液相色谱，将 3 种状态质粒重复分析 6 次，考察方法重复性。结果显示，保留时间 RSD 小于 0.09%，峰面积 RSD 小于 1.72%，重复性结果良好。

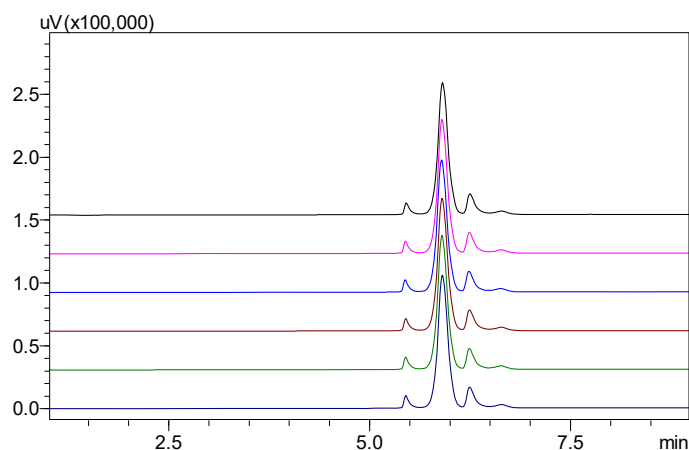


图 2. 三种状态质粒重复分析色谱图比较 (n=6)

表 3. 三种状态质粒重复性实验结果 (n=6)

质粒状态	保留时间 RSD(%)	峰面积 RSD(%)
开环质粒	0.08	1.72
超螺旋质粒	0.09	1.10
线性质粒	0.09	0.69

3. 结论

本文使用生物惰性液相色谱仪分析质粒样品，发现温度对 3 种不同构型质粒的分离影响明显，通过调整温度，可以实现 3 种构型的分离度均大于 1.5。质粒在惰性液相中无残留，此时保留时间和峰面积重复性结果均佳。此方法适用于质粒样品的三种构型分析。

四、核酸药物递送系统分析

核酸药物进入细胞面临两大挑战，一是核酸药物进入体内循环容易被核酸酶降解，并且也有造成免疫原性的风险；另一个是带负电且分子较大的核酸药物难以穿透同样带负电的细胞膜进入细胞内。因此，核酸药物递送系统应运而生，它可以保护核酸药物避免其被核酸酶降解，减小免疫原性，也能帮助核酸药物穿透细胞膜到达细胞内部，是核酸药物实现体内稳定性、安全性和有效性的关键技术。

寡核酸药物的递送系统主要有脂质体纳米递送系统、共轭连接递送系统（小分子配体、抗体和其他分子）、聚合物基质递送系统和其他递送系统（无机纳米颗粒、外泌体和病毒转染等）。其中应用较为广泛的是脂质体纳米递送系统和 GalNAc（N-乙酰半乳糖胺）共轭连接递送系统。mRNA 疫苗或药物常用的递送系统是脂质纳米颗粒（LNP），主要由 PEG 修饰脂质、胆固醇、辅助中性脂质和可离子化脂质（或阳离子脂质）四种成分组成，这四种成分协同作用，护送有效成分 mRNA 穿透细胞膜，并在细胞质中有效地释放。因此，脂质纳米粒中四种成分的含量对优化 mRNA 药物的给药方式，药效研究等具有重要意义。国家药品监督管理局（NMPA）药品审评中心于 2020 年 8 月颁布的《新型冠状病毒预防用 mRNA 疫苗药学研究技术指导原则》（试行）建议对递送系统中各组分的含量进行检测。

本章介绍了使用岛津液相色谱系统结合蒸发光散射检测器测定脂质纳米粒中四种成分含量和聚合物基质递送系统 PEI（聚乙烯亚胺）含量的分析方法。脂质和聚合物通常没有紫外吸收，故很适合采用通用型检测器——蒸发光散射检测器进行含量测定。岛津蒸发光散射器 ELSD-LT III 具有高灵敏度、宽线性范围的优点，并且还具备动态调整增益的功能，一次进样可同时分析高浓度和低浓度的化合物，操作方便。

本章还介绍了使用 MALDI-TOF 进行脂质纳米粒四种成分原料分子量测定和 PEG 修饰脂质分子量分布测定和批间一致性评估的应用案例，方法操作简单、分析速度快，结果直接可靠，可为脂质成分原料质控提供参考。

表 1. 梯度洗脱时间程序

时间(min)	单元	处理命令	值
3.00	泵	B Conc	80
4.00	泵	B Conc	85
5.50	泵	B Conc	100
12.00	泵	B Conc	100
12.10	泵	B Conc	80
15.00	泵	B Conc	80

1.3 流动相、标准品及供试品配制

流动相 A: 准确称取 1.01 g 三乙胺于 1000 mL 水中, 混匀, 用乙酸调节 pH 至 7.0 即得;

流动相 B: 准确称取 1.01 g 三乙胺于 1000 mL 甲醇中, 混匀, 用乙酸调节 pH 至 7.0 即得;

对照品储备液: 称取标准品适量, 用甲醇溶解稀释成 20 mg/mL;

标准溶液: 取适量对照品储备液, 用水稀释, 配制浓度为: 5、10、20、50、100、200、250 $\mu\text{g/mL}$ 的标准溶液。

供试品溶液制备: 用甲醇将样品稀释 10 倍, 混匀即得。

2. 结果与讨论

2.1 标准溶液色谱图

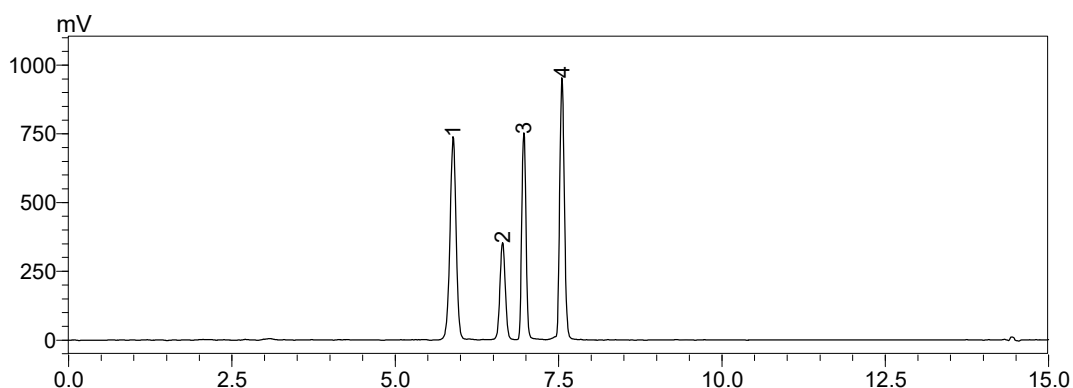
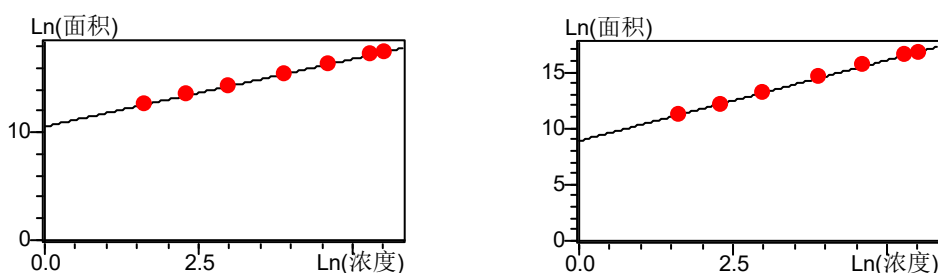


图 1. LNP 中四种成分对照溶液色谱图 (50 $\mu\text{g/mL}$)

1: 阳离子脂质; 2: 胆固醇; 3: PEG; 4: 中性脂质

2.2 校准曲线

按 1.2 中的分析条件进行测定, 以浓度为横坐标, 峰面积为纵坐标, 采用外标法建立指数标准曲线, 结果如图 2 所示, 四种组分在 5~250 $\mu\text{g/mL}$ 线性浓度范围内, 线性相关性良好, 具体线性相关系数及准确度如表 2 所示。



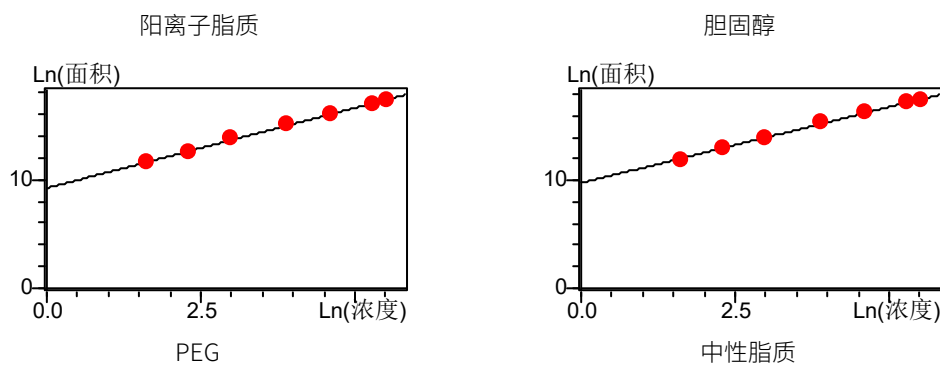


图 2. LNP 中四种组分校准曲线

表 2 校准曲线、线性相关系数及准确度结果表

化合物名称	标准曲线	相关系数 r	准确度 (%)
阳离子脂质	$\lg Y = 1.25165 \lg X + 10.5328$	0.9998	96.3~102.5
胆固醇	$\lg Y = 1.43447 \lg X + 8.87104$	0.9995	95.2~105.8
PEG	$\lg Y = 1.47742 \lg X + 9.22230$	0.9994	96.8~108.0
中性脂质	$\lg Y = 1.40980 \lg X + 9.77045$	0.9994	94.2~106.6

2.3 精密度实验

按照 1.2 分析条件，将浓度为 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的对照品溶液重复分析 6 次。4 个化合物保留时间 RSD 小于 0.1%，峰面积 RSD 小于 3%，具体结果见表 3、4 所示。实验结果表明，生物兼容液相系统 Nexera Bio 具有良好的精密度。

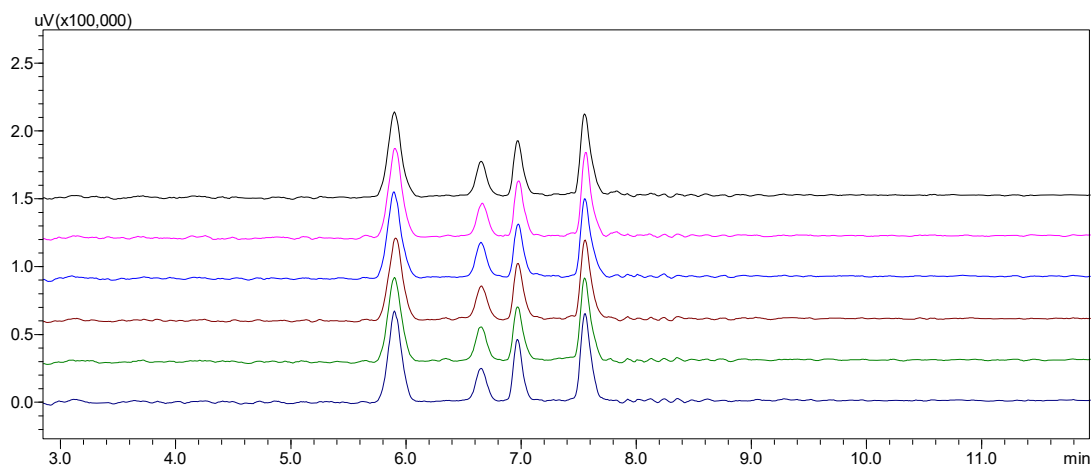


图 3 对照品溶液重复性色谱图 (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$)

表 3 对照品溶液 (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 保留时间精密度结果 (n=6)

化合物	保留时间(min)						RSD(%)
	1	2	3	4	5	6	
阳离子脂质	5.900	5.904	5.896	5.912	5.901	5.900	0.093
胆固醇	6.652	6.663	6.652	6.656	6.651	6.652	0.067
PEG	6.971	6.978	6.976	6.972	6.97	6.969	0.052
中性脂质	7.552	7.562	7.554	7.556	7.552	7.555	0.049

表 4 对照品溶液 (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 峰面积精密度结果 (n=6)

化合物	峰面积						RSD(%)
	1	2	3	4	5	6	
阳离子脂质	525,268	550,962	549,963	528,887	526,627	549,792	2.38
胆固醇	163,921	160,135	161,205	165,899	164,374	163,692	1.31
PEG	222,070	229,240	231,085	226,837	229,765	240,330	2.62
中性脂质	363,486	374,596	384,406	395,699	371,933	377,795	2.93

2.4 样品含量测定

按照 1.3 中供试品溶液处理方法对样品进行处理, 上机分析, 样品色谱图如图 4 所示, 定量结果如表 5 所示。

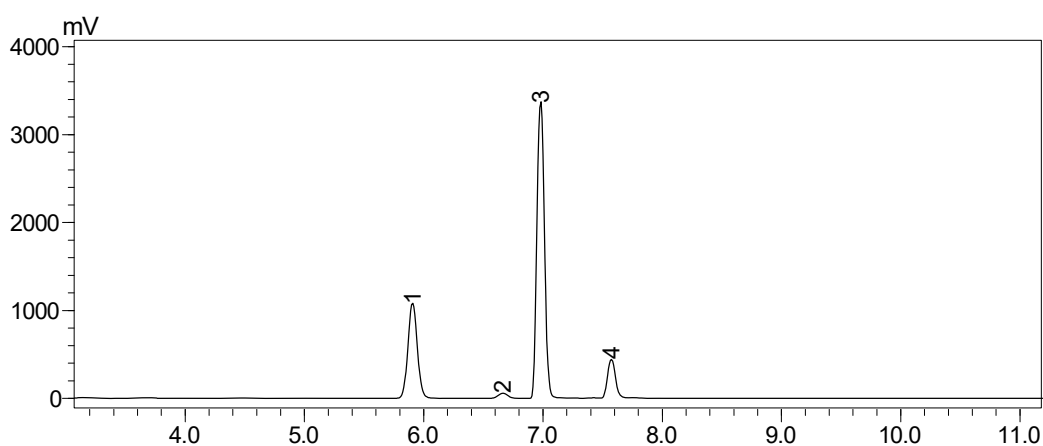


图 4 LNP 样品色谱图

表 5 LNP 中 4 种物质定量结果

No.	化合物	保留时间(min)	峰面积	上机浓度 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	样品浓度 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)
1	阳离子脂质	5.902	5957754	57.3	573
2	胆固醇	6.658	346489	15.0	150
3	PEG	6.977	15238244	141.5	1415
4	中性脂质	7.569	1969025	28.5	285

3. 结论

本文采用岛津 Nexera Bio 高效液相色谱仪联合蒸发光散射检测器 III, 建立了脂质纳米粒 LNP 四种成分含量测定的方法。该方法中, LNP 四种成分在 5~250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 线性范围内线性良好, 相关系数均大于 0.999。精密度实验中, 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 对照品溶液保留时间 RSD<0.1%, 峰面积 RSD<3%。实验结果表明, 该方法能快速准确地测定 LNP 四种成分的含量。

生物兼容液相 Nexera Bio 联合蒸发光散射检测器测定 mRNA 递送介质 DMG-PEG2000 的含量

摘要: 本文采用岛津生物兼容液相 Nexera Bio, 建立了 mRNA 递送介质 DMG-PEG2000 脂质体含量测定的方法。该方法中, DMG-PEG2000 在 5~200 μ g/mL 范围内线性良好, 相关系数为 0.9982。精密度实验中, DMG-PEG2000 的保留时间 RSD% 为 0.06-0.20%, 峰面积 RSD% 为 0.56-2.14%。实验结果表明, 该方法能快速准确地测定 DMG-PEG2000 脂质体的含量。

关键词: Nexera Bio 脂质体 mRNA

mRNA 是带有负电荷的长链大分子, 而细胞膜表面也带有负电荷, 静电排斥使得 mRNA 分子较难穿过细胞膜进入细胞内。并且, 因为 mRNA 分子是单链, 本身极其脆弱, 体内的多种酶都能将它迅速降解。mRNA 编码信息中涵盖了核糖体生成蛋白的序列, 必须递送至细胞内才能编码蛋白。因此需要合适的递送介质将 mRNA 递送到细胞内部。

mRNA 疫苗/药物递送载体主要包括病毒载体和非病毒载体。病毒载体以慢病毒、腺相关病毒、仙台病毒等载体为主的病毒载体虽能进行核酸递送, 但可能会因载体引起的免疫反应而受到限制, 影响其应用。而非病毒载体主要包括脂质体、树突细胞、无机纳米粒子、阳离子细胞穿膜肽等。目前, 脂质载体已成为递送 mRNA 最为有效的非病毒载体。目前, 用于递送 mRNA 的非病毒载体中以脂质体应用的最为广泛, 主要包括阳离子脂质体复合物、脂质体聚合物、脂质体纳米粒、阳离子纳米乳等。

DMG-PEG2000 (1,2-二肉豆蔻酰-rac-甘油-3-甲氧基聚乙二醇) 是一种新型的 mRNA 疫苗/药物阳离子脂质体递送介质, 随着新冠疫苗的火热研制而迅速蹿红被大家认识, 该材料是通过 PEG 化修饰了一种短链脂质, DMG-PEG2000 的短链 (肉豆蔻酸, C14) 比 DSPE-mPEG2000 长链 (硬脂酸, C18) 半衰期小可更快降解, 可降低脂质体与细胞间的相互作用。

DMG-PEG2000 的含量检测会对优化 mRNA 药物的给药方式, 药效研究等具有重要意义。

本实验使用生物兼容液相 Nexera Bio 联合蒸发光散射器建立了 mRNA 递送介质 DMG-PEG2000 的含量测定方法, 该方法分析速度快, 准确度高。

1 实验部分

1.1 仪器

生物兼容液相系统 Nexera Bio, 配置信息如下:

系统控制器	: CBM-20A	自动进样器	: SIL-20AC XR
输液泵	: LC-20AD XR	脱气机	: DGU-20A 3R
检测器	: ELSD-LT II	色谱工作站	: Labsolutions Ver. 5.98

1.2 分析条件

色 谱 柱 : Shim-pack Scepter C4-300 (50 mm × 2.1 mm I.D., 1.9 μ m, 岛津 (上海) 实验器材有限公司岛津, P/N: 227-31175-03)

流 动 相 A : 10 mmol 三乙胺乙酸 (TEAA) 水溶液 (pH 7.0)

流 动 相 B : 10 mmol 三乙胺乙酸 (TEAA) 甲醇溶液 (pH 7.0)

流 速 : 0.5 mL/min 柱 温 : 55 $^{\circ}$ C

进 样 体 积 : 10 μ L 雾 化 气 : 350 MPa

检 测 器 温 度 : 40 $^{\circ}$ C 检 测 器 增 益 : 4 (\times 8)

洗 脱 方 式 : 梯度洗脱, B 相起始浓度为 70%, 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
2.00	泵	B Conc	70
6.00	泵	B Conc	100
14.00	泵	B Conc	100
14.10	泵	B Conc	70
18.01	控制器	Stop	

1.3 流动相和标准品配制

流动相 A: 取 10 mmol 的三乙胺于适量水中, 用乙酸调节 pH 至 7.0, 后稀释至 1000 mL 混匀, 超声脱气即得;

流动相 B: 取 10 mmol 的三乙胺于适量甲醇中, 用乙酸调节 pH 至 7.0, 后稀释至 1000 mL 混匀, 超声脱气即得;

对照品储备液制备: 称取标准品 5.09 mg, 用水溶解稀释成 5 mg/mL;

利用对照品储备液配制线性标曲, 浓度分别为 5, 10, 20, 50, 100, 200 μ g/mL。

2. 结果与讨论

2.1 标准曲线

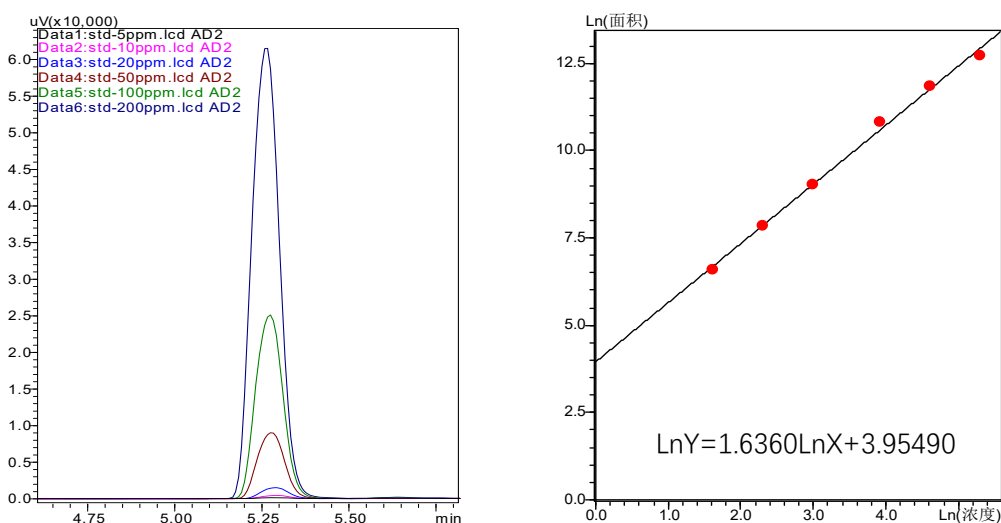


图 1. DMG-PEG2000 对照溶液 (5~200 μ g/mL) 图谱 (左) 和 DMG-PEG2000 标准曲线 (右)

按 1.2 中的分析条件进行测定，以浓度为横坐标，峰面积为纵坐标，采用外标法建立指数标准曲线，结果如图 2 所示，DMG-PEG2000 在 5-200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 线性浓度范围内，线性相关性良好，相关系数为 0.9982，准确度为 89.3~114.2% (图 1)。

2.2 精密度实验

按照 1.2 分析条件测定，选择浓度为 5、20 和 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 DMG-PEG2000 对照品溶液分别连续进样测定 6 次。DMG-PEG2000 的保留时间 RSD% 为 0.06-0.20%；峰面积 RSD% 为 0.56-2.14%，结果见表 2 所示。实验结果表明，生物兼容液相系统 Nexera Bio 具有良好的精密度。

表 2. DMG-PEG2000 对照品溶液精密度实验结果 (n=6)

序号	5 $\mu\text{g}/\text{mL}$		50 $\mu\text{g}/\text{mL}$		200 $\mu\text{g}/\text{mL}$	
	R.T.	Area	R.T.	Area	R.T.	Area
1	5.285	667	5.252	48670	5.234	325037
2	5.279	638	5.255	47057	5.217	325328
3	5.269	636	5.256	49066	5.231	328397
4	5.271	648	5.256	47926	5.242	324382
5	5.275	641	5.257	49793	5.242	324062
6	5.297	626	5.262	47763	5.246	327871
平均值	5.279	643	5.256	48379	5.235	325846
RSD(%)	0.20	2.14	0.06	2.04	0.20	0.56

2.3 样品含量测定

将供试品 mRNA 疫苗制剂利用纯水稀释 50 倍后进样分析，结果如表 3 所示。最终折算样品中 DMG-PEG2000 的含量为 1760 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

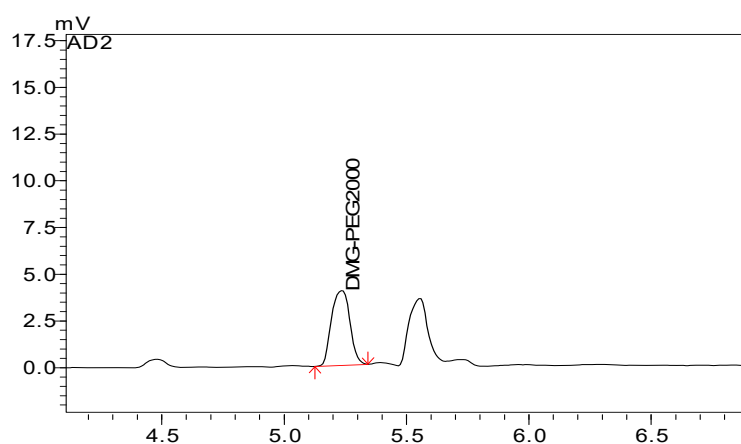


图 2. 稀释后供试品溶液色谱图

表 3. mRNA 疫苗制剂中 DMG-PEG2000 含量测定结果

化合物名称	保留时间	峰面积	稀释后浓度 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	样品中 DMG-PEG2000 含量 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)

DMG-PEG2000	5.236	21717	35.200	1760
-------------	-------	-------	--------	------

3. 结论

本实验使用岛津生物兼容液相系统Nexera Bio联合蒸发光散射检测器，建立了DMG-PEG2000的含量测定方法。结果表明，DMG-PEG2000在5~200 $\mu\text{g/mL}$ 线性范围内线性良好，相关系数为0.9982。精密度实验中，连续进样6针，DMG-PEG2000的保留时间RSD为0.06-0.20%；峰面积RSD为0.56-2.14%，仪器精密度良好。该实验方法分析速度快，准确性好。

高效液相色谱仪联合蒸发光散射检测器测定 siRNA 递送介质聚乙烯亚胺

摘要: 本文采用岛津高效液相色谱仪联合蒸发光散射检测器建立了 siRNA 递送介质聚乙烯亚胺的定量方法。该方法中, 聚乙烯亚胺在 1~100 $\mu\text{g/mL}$ 线性范围内线性良好, 线性相关系数为 0.9994。精密度实验中, 2 $\mu\text{g/mL}$ 标准溶液保留时间 RSD 为 0.13%, 峰面积 RSD 为 2.29%。分析实际 siRNA 制剂样品, 定量准确度为 95.1~102.7%。实验结果表明, 该方法能快速准确地定量分析 siRNA 递送介质聚乙烯亚胺。

关键词: ELSD-LT III 聚乙烯亚胺 siRNA

siRNA (Small interfering RNA), 小干扰核苷酸, 是小核酸药物的一种, 是与小分子药物、抗体药物完全不同的全新药物类别, 药物构成为核苷酸序列, 药物作用于 mRNA, 通过基因沉默抑制靶蛋白的表达, 从而实现治疗疾病的目的, 是生物制药创新的战略性前沿领域。

siRNA 在体内不稳定, 易被体内核酸酶降解, 同时 siRNA 分子结构较大, 且带负电荷, 穿透细胞膜的难度较大, 因此需要借助递送系统进入细胞并起作用。目前常用的递送载体可以分为病毒载体和非病毒载体。病毒载体转染效率高, 但是制备及纯化困难, 携带基因容量小, 且具有潜在致病性。非病毒载体具有安全性、低毒性、低免疫原性等优点, 被认为是比病毒载体更理想的 siRNA 递送载体。在众多非病毒递送载体中, 聚乙烯亚胺 (polyethyleneimine, PEI) 是目前研究较广泛的非病毒载体之一。

PEI 是一种阳离子聚合物, 一般来说, 分子量越大, 转染活性越高, 但毒性也越强, 因此, 能否准确、高灵敏度地检出 PEI 在相关产品中的含量对产品的安全性和质量控制意义重大。PEI 带大量正电荷, 分子量大, 本次实验中 PEI 分子量约为 4 万, 在一般反相色谱系统上没有保留, 且 PEI 没有显著的紫外吸收基团, 所以本文采用离子对反相色谱系统结合蒸发光检测器检测 PEI, 灵敏度高、线性范围广、重复性好。

1. 实验部分

1.1 仪器

高效液相色谱仪 LC-40B XR, 配置信息如下:

系统控制器	: CBM-40lite	自动进样器	: SIL-40C XR
输液泵	: LC-40B XR	脱气机	: DGU-4003
柱温箱	: CTO-40C	检测器	: ELSD-LT III
色谱工作站	: Labsolutions Ver. 5.114		

1.2 分析条件

色谱柱	: 岛津 PEI 专用色谱柱	流动相	: 离子对试剂
进样体积	: 10 μL	流速	: 1.0 mL/min
检测器	: ELSD-LT III	柱温	: 40°C
增益	: Wide	漂移管温度	: 60°C
雾化气压力	: 360 KPa		
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，用超纯水水逐级稀释，配制浓度为：1、2、5、10、20、50、100 μg/mL 的标准溶液。

样品溶液制备：采用碱性溶液溶解样品，用超纯水稀释分别稀释12.5，40和250倍，得到不同浓度样品后上机分析。

2. 结果与讨论

2.1 标准溶液色谱图

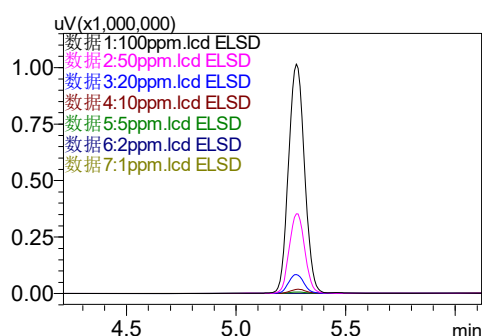


图 1. PEI 色谱图 (浓度 1~100 μg/mL)

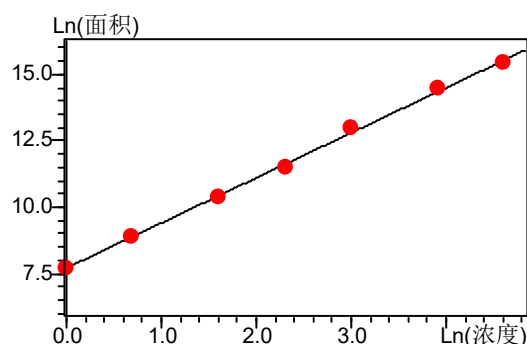


图 2. PEI 校准曲线

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，以浓度的对数为横坐标，峰面积的对数为纵坐标，采用外标法建立对数校准曲线，校准曲线如图 2 所示，线性关系为 $\text{Ln}Y = 1.69913 \times \text{Ln}X + 7.71015$ ，线性相关系数 r 为 0.9994，准确度为 94.3~109.1%。

ELSD-LT III 具有独创的动态范围扩展功能，线性范围广，且无需根据样品浓度优化增益值，可直接将增益设置为 wide 模式，此时，低浓度样品灵敏度高，高浓度样品不易饱和。

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 PEI 保留时间 RSD 为 0.13%，峰面积 RSD 为 2.29%，具体见见表 2。

表 2. 精密度实验结果

No	1	2	3	4	5	6	RSD%
保留时间	5.275	5.275	5.292	5.283	5.275	5.283	0.13
峰面积	9,606	9,657	9,790	9,920	9,713	9,267	2.29

2.4 样品含量测定

按照 1.3 中处理方法对 siRNA 制剂样品进行处理，处理后样品理论浓度分别为 4、25、80 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ，重复测试 3 次，定量结果准确度分别为 102.7%、98.4%、95.1%，测量准确度高。样品色谱图如图 3 所示，定量具体结果如表 2 所示。

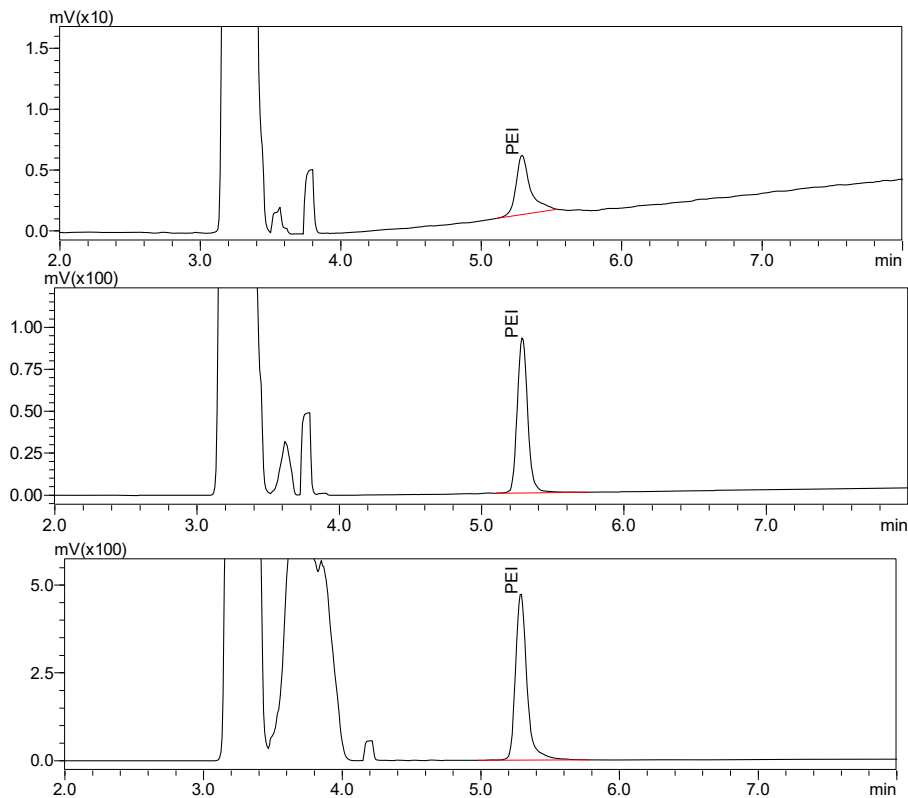


图 3. 样品色谱图 (理论浓度: 上-4 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 中-25 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 下-80 $\mu\text{g}/\text{mL}$)

表 2. 样品中 PEI 定量结果 (n=3)

No.	理论浓度 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	测试浓度 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	定量准确度 (%)	RSD (%)
1	4	4.11	102.70%	2.20%
2	25	24.6	98.40%	0.92%
3	80	76.07	95.10%	1.01%

3. 结论

本文采用岛津高效液相色谱仪联合蒸发光散射检测器建立了 siRNA 递送介质聚乙烯亚胺的定量方法。该方法中，聚乙烯亚胺在 1~100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 线性范围内线性良好，线性相关系数为 0.9994。精密度实验中，2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 标准溶液保留时间 RSD 为 0.13%，峰面积 RSD 为 2.29%。分析实际样品，定量准确度为 95.1~102.7%。实验结果表明，该方法能快速准确地定量分析 siRNA 递送介质聚乙烯亚胺。

应用台式 MALDI-TOF MS 分析 mRNA 药物递送系统脂质纳米粒的原料分子量

摘要: 本文应用岛津台式 MALDI-TOF 质谱仪 MALDI-8020 对 mRNA 药物及疫苗生产所用的脂质纳米粒 (LNPs) 的四种原料 (可电离脂质、中性辅助脂质、胆固醇和 PEG 修饰脂质) 进行质谱分析, 可以快速检测原料样品的分子量及组成信息。本方法操作简便、分析速度快, 结果直接可靠, 为 mRNA 药物及疫苗递送介质原料的质量控制提供了参考。

关键词: MALDI-TOF 脂质纳米粒 原料 分子量

脂质纳米粒 (LNPs) 是目前 mRNA 药物和疫苗研究应用最多的递送系统, 也可用于递送寡核苷酸药物, 通常由可电离脂质, 胆固醇, 中性辅助脂质和 PEG 修饰脂质四种成分组成。可电离脂质的头部氨基在酸性条件下会质子化并带正电荷, 这使其对 RNA 有很强的包载能力, 增强体内逃逸。胆固醇常作为 LNP 配方的结构脂质, 可以增强 LNP 的稳定性, 介导 LNP 内吞, 并有利于确保 LNP 的双层结构及脂质的流动性。辅助性中性脂质一般为饱和磷脂, 可以自发地组织形成脂质双层。PEG 修饰脂质位于脂质纳米粒表面, 其亲水端 (PEG 链) 向外形成脂质纳米粒的保护性外壳, 可以阻止血清蛋白吸附和单核吞噬细胞系统的摄取, 同时防止 LNP 颗粒聚集, 提高 LNP 的稳定性。

不同供应商的 LNPs 原料质量不一, 原料质量的细小变化可能会造成 LNP 形态及 mRNA 包裹效果的差异, 最终对 mRNA 药物和疫苗的有效性及其作用发挥的稳定性产生影响。因此, 对作为 LNPs 主要原料的分子量进行监测, 保证原料批次间的一致性与稳定性, 对保障 mRNA 药物临床效果的有效性及其稳定性具有重要意义。本文应用台式 MALDI-TOF 质谱仪 MALDI-8020 对可电离脂质 DLin-MC3-DMA 与 SM-102、中性辅助脂质 DSPC、胆固醇、PEG 修饰脂质 DMG-PEG2000 等 5 种 LNPs 常见的原料样品进行分子量检测, 同时可以对样品的纯度进行确认, 可作为核酸药物和疫苗辅料质控的参考。

1. 实验部分

1.1 仪器

台式基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱仪 MALDI-8020

1.2 分析条件

调谐模式	: 线性正离子模式	激光能量	: 70-80
激光器	: 355 nm 固态激光器	离子门阈值	: 300
扫描范围	: m/z 300-4000	脉冲引出质量(Da)	: 1800

1.3 样品前处理

称取样品用甲醇溶解, 配制为 1 mg/mL 的样品溶液。取 0.5 μ L NaTFA 溶液 (1 mg/mL)、1 μ L 样品溶液和 1 μ L 基质溶液 (30 mg/mL) 依次点靶, 自然干燥后将靶板送入质谱分析。各样品对应的基质信息见下表。

表1 各样品对应的基质及辅助盐信息

样品	Dlin-MC3-	SM-102	Cholester	DSPC	DMG-
基质	DHB	DHB	9-AA	DHB	葱三酚
盐	NaTFA	NaTFA	-	NaTFA	NaTFA

2. 结果与讨论

2.1 可电离脂质、中性辅助脂质、胆固醇分子量检测

应用 MALDI-8020 检测可电离脂质 Dlin-MC3-DMA 与 SM-102、中性辅助脂质 DSPC、结构脂质胆固醇的分子量，结果如图 1 所示，分子量检测信息见表 2。

图 1A 为可电离脂质 Dlin-MC3-DMA 的质谱图，样品检测到 m/z 642.51、 m/z 690.47 的离子峰，其中 m/z 642.51 为 Dlin-MC3-DMA 的加氢峰 ($[M+H]^+$ ，理论值为 m/z 642.62)， m/z 690.47 推测为杂质。

图 1B 为可电离脂质 SM-102 的质谱图，样品检测到 m/z 710.55 的离子峰，对应 SM-102 的加氢峰 ($[M+H]^+$ ，理论值为 m/z 710.67)。

图 1C 为中性辅助脂质 DSPC 的质谱图，样品检测到 m/z 790.56 与 m/z 1580.22 的离子峰，前者对应 DSPC 的加氢峰 ($[M+H]^+$ ，理论值为 m/z 790.63)，后者对应 DSPC 的二聚体加氢峰 ($[2M+H]^+$ ，理论值为 m/z 1580.26)。

图 1D 为胆固醇的质谱图，样品检测到 m/z 387.28 的离子峰，对应胆固醇的加氢峰 ($[M+H]^+$ ，理论值为 m/z 387.36)。样品整体纯度较好，质谱图上杂质峰较少。

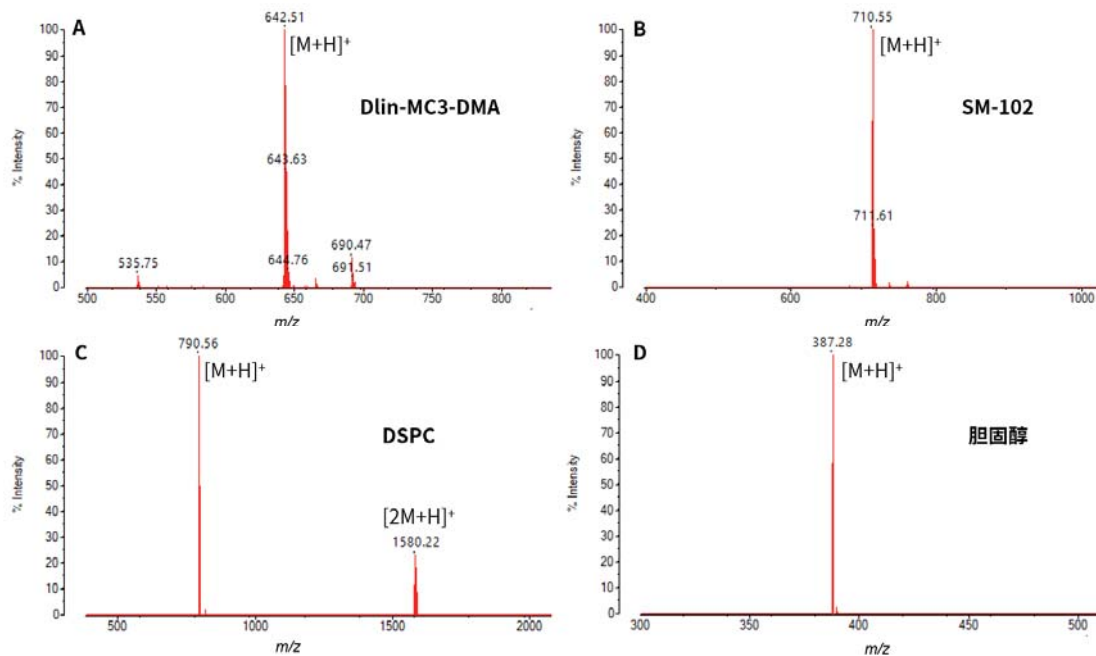


图 1. 样品检测质谱图. A: Dlin-MC3-DMA; B: SM-102; C: DSPC; D: 胆固醇

表2. 样品分子式及分子量检测结果

名称	分子式	[M+H] ⁺ mono 理论值	实测值 (m/z)
Dlin-MC3-DMA	C ₄₃ H ₇₉ NO ₂	642.62	642.51
SM-102	C ₄₄ H ₈₇ NO ₅	710.67	710.55
DSPC	C ₄₄ H ₈₈ NO ₈ P	790.63	790.56
胆固醇	C ₂₇ H ₄₆ O	387.35	387.28

2.2 PEG修饰脂质DMG-PEG2000分子量检测

应用 MALDI-8020 对 PEG 修饰脂质 DMG-PEG2000 原料进行检测, 质谱图见图 2。由图可见, 样品在 m/z 1900-3100 范围内检测到一系列分子量依次相差 44 Da 的聚合物离子峰。使用聚合物软件 Polymerix (Sierra Analytics) 分析样品, 分析结果示例见图 3, 样品化学式为 C₃₂H₆₂O₅(C₂H₄O)_n-Na, 对应 DMG-PEG2000 (分子式 C₃₂H₆₂O₅(C₂H₄O)_n) 的钠离子加合峰。Polymerix 软件自动计算得到的数均分子量 M_n、重均分子量 M_w、质均分子量 M_z、多分散度 PD、聚合度 DP 等相关信息见图 3。

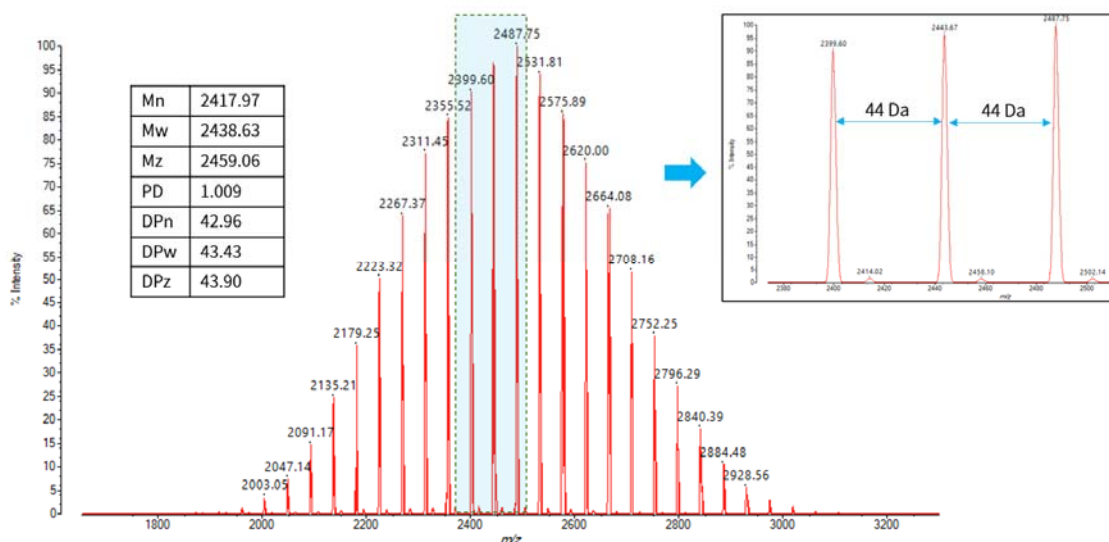


图 2. DMG-PEG2000 样品质谱图

Monopolymer Results Summary																
Series Label	Mn	Mw	Mz	PD	DPn	DPw	DPz	Percent Series	Percent Spectrum	Alpha End Group	Repeat	Omega End Group	Charge State	Adduct	Loss	Series Formula
Total/Average	2417.966	2438.629	2459.058	1.009	42.963	43.433	43.897	100.00	100.00	CH3O	C2H4O	C31H59O4	1 Na			CH3O [C2H4O] _n C31H59O4 + Na
S1	2417.966	2438.629	2459.058	1.009	42.963	43.433	43.897	100.00	100.00	CH3O	C2H4O	C31H59O4	1 Na			CH3O [C2H4O] _n C31H59O4 + Na

图3. Polymerix软件分析结果

3. 结论

本文应用台式基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱 MALDI-8020 检测了 4 类不同类型的 LNPs 原料样品, 包括可电离脂质、中性辅助脂质、胆固醇与中性辅助脂质, 得到了具体的分子量分布及组成信息, 为 LNPs 原料的质量控制提供了依据。本方法操作简单、检测成本低、分析速度快, 结果直接、准确、可靠, 可作为 mRNA 药物及疫苗递送介质原料质控的参考。

应用台式 MALDI-TOF MS 分析 mRNA 药物递送基质 DMG-PEG2000 的分子量分布及组成

摘要: 本文应用岛津台式 MALDI-TOF 质谱仪 MALDI-8020 对 mRNA 药物及疫苗生产所用的脂质纳米粒 (LNPs) 成分 DMG-PEG2000 进行质谱分析, 可直接检测到不同来源原料样品的分子量分布及组成信息。本方法操作简便、分析速度快, 结果直接可靠, 为 mRNA 药物及疫苗递送介质原料的质量控制提供了参考。

关键词: MALDI-TOF 脂质纳米粒 DMG-PEG2000 分子量

脂质纳米粒 (LNPs) 是目前 mRNA 药物和疫苗研究应用最多的递送系统, 通常由辅助性中性脂质, 胆固醇, PEG 修饰脂质, 阳离子脂质四种成分组成。LNP 组装时, PEG 修饰脂质位于脂质纳米粒表面, 它的疏水端与阳离子脂质的疏水端结合, 亲水端 (PEG 链) 则向外形成脂质纳米粒的保护性外壳, 可以阻止血清蛋白吸附和单核吞噬细胞系统的摄取, 延长了体内的循环时间, 同时防止 LNP 颗粒聚集, 提高 LNP 的稳定性。常用的 PEG 修饰脂质包括 DMG-PEG2000, DSPE-mPEG2000 等, 其中 DMG-PEG2000 (1,2-二肉豆蔻酰-rac-甘油-3-甲氧基聚乙二醇 2000) 随着新冠肺炎 mRNA 疫苗的火热研制而迅速蹿红。

不同来源的DMG-PEG2000原料样品的分子量分布可能有所不同, 而这些分子组成上细小的变化可能会造成LNP形态及mRNA包裹效果的差异, 最终对mRNA药物和疫苗的有效性及其作用发挥的稳定性产生影响。因此, 对作为LNP主要原料的DMG-PEG2000的分子量分布进行监测, 保证原料批次间的一致性与稳定性, 对保障mRNA药物临床效果的有效性及其稳定性具有重要意义。

本文应用台式MALDI-TOF质谱仪MALDI-8020对5份不同来源的DMG-PEG2000原料样品的分子量组成进行检测, 结合聚合物分析软件Polymerix, 获得了各原料样品的分子量信息, 确认了样品间分子量组成差异的存在。该检测方法操作简单、分析速度快, 结果直接可靠, 可作为核酸药物和疫苗PEG类辅料质控的参考。

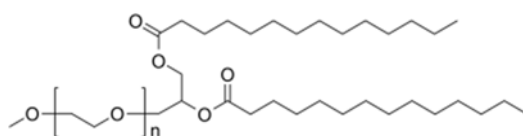


图1. DMG-PEG2000的结构式

1. 实验部分

1.1 仪器

台式基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱仪 MALDI-8020

1.2 分析条件

调谐模式	: 线性正离子模式	激光能量	: 80
激光器	: 355 nm 固态激光器	离子门阈值	: 500
扫描范围	: m/z 500-10000	脉冲引出质量(Da)	: 2500

1.3 样品前处理

将称取好的样品使用甲醇溶解，配制为1 mg/mL的样品溶液。取0.2 μL NaTFA溶液、1 μL 样品溶液和1 μL 蒽三酚基质溶液依次点靶，自然干燥后将靶板送入质谱分析。

2. 结果与讨论

应用 MALDI-8020 对 5 份不同来源的 DMG-PEG2000 原料进行检测，质谱图见图 2。由图可见，样品在 m/z 1800-3300 范围内检测到一系列分子量依次相差 44 Da 的聚合物离子峰。使用聚合物软件 Polymerix (Sierra Analytics) 分析样品，分析结果示例见图 3，样品由两个离子峰系列组成，主峰系列 (S1) 的化学式为 $\text{C}_{32}\text{H}_{62}\text{O}_5(\text{C}_2\text{H}_4\text{O})_n\text{-Na}$ ，副峰系列 (S2) 的化学式为 $\text{C}_{32}\text{H}_{62}\text{O}_5(\text{C}_2\text{H}_4\text{O})_n\text{-K}$ ，分别对应 DMG-PEG2000 (分子式 $\text{C}_{32}\text{H}_{62}\text{O}_5(\text{C}_2\text{H}_4\text{O})_n$) 的钠离子与钾离子加合峰。Polymerix 软件自动计算得到的数均分子量 M_n 、重均分子量 M_w 、质均分子量 M_z 、多分散度 PD、聚合度 DP 等相关信息见表 1，5 份样品的分子量分布存在一定差异。

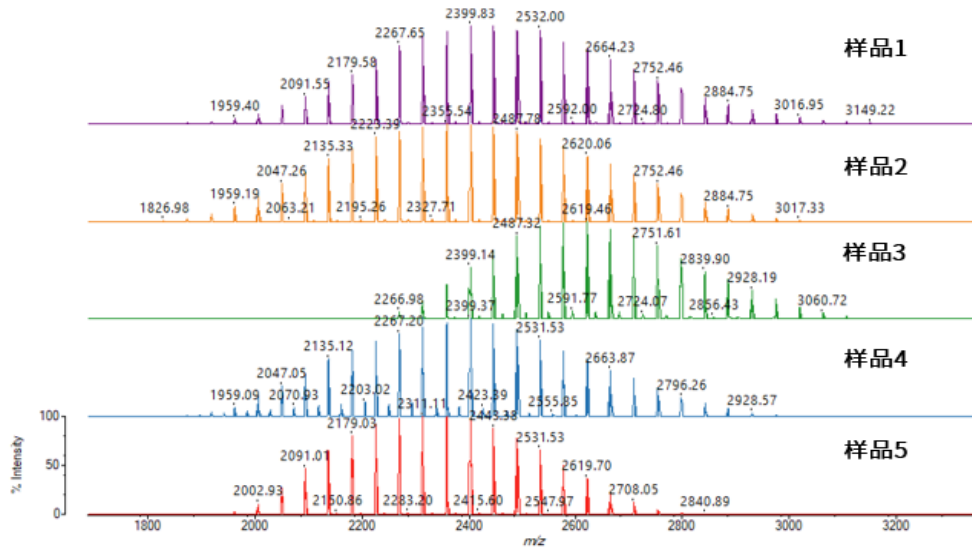


图 2. DMG-PEG 样品质谱图

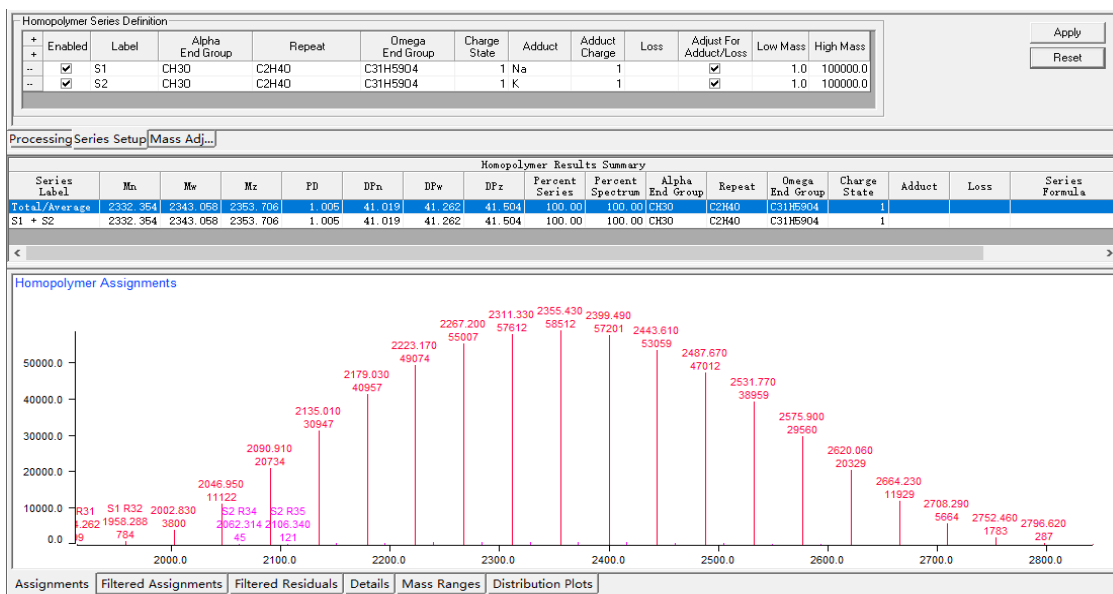


图 3. Polymerix 分析界面示例 (样品 5)

表1. 样品分子量统计信息 (分析软件: Polymerix)

名称	M _n	M _w	M _z	PD	DP _n	DP _w	DP _z
样品 1	2462.05	2480.54	2498.95	1.008	43.97	44.39	44.80
样品 2	2390.19	2409.59	2428.78	1.008	42.33	42.77	43.21
样品 3	2610.60	2620.92	2631.28	1.004	47.34	47.57	47.81
样品 4	2391.86	2407.48	2422.98	1.007	42.37	42.73	43.08
样品 5	2332.35	2343.07	2353.71	1.005	41.02	41.26	41.50

将样品质谱图局部放大 (图 4), 可以观察到样品 1、2、3、5 均由 C₃₂H₆₂O₅(C₂H₄O)_n 的钠离子与钾离子加合峰组成, 样品 4 检测到比 S1 依次大 24 Da 的离子峰, 表明样品中可能存在端基结构与主峰不同的聚合物形式, 该聚合物形式也可能是主成分一定程度的降解产物。

由以上结果可知, 每种样品的 PEG 组成成分有所不同, 而这些成分上的差异可能会对 LNP 形态及 mRNA 药物包裹的效果造成影响, 因此, 对 DMG-PEG2000 的分子量分布及组成进行监测是 mRNA 药物和疫苗生产重要的质量控制依据。

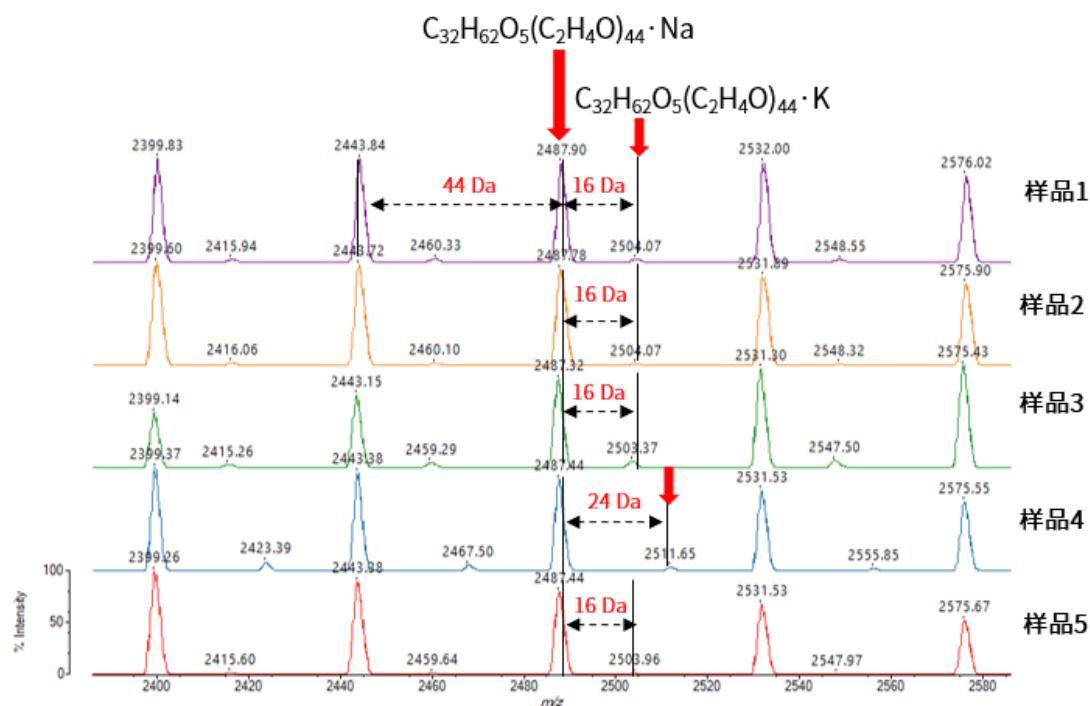


图 4. DMG-PEG 样品质谱局部放大图

3. 结论

本文应用台式基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱 MALDI-8020 检测了 5 份不同来源的 DMG-PEG2000 原料样品, 得到了具体的分子量分布及组成信息, 为 DMG-PEG2000 的质量控制提供了依据。本方法操作简单、检测成本低、分析速度快, 结果直接、准确、可靠, 可作为 mRNA 药物及疫苗递送介质中 PEG 类原料质控的参考。