

### 使用 LCMS™-8060 进行 siRNA 型寡核苷酸的定量分析和分子量测定

#### ■ 前言

核酸类药物是为结合特异性靶 RNA 和蛋白质设计的合成寡核苷酸。在此之前获得批准的核酸类药物大多是反义型，此外，还有适体型和 siRNA 型获得了批准。大多数的核酸类药物为 20 个碱基左右，分子量为 6000 左右。通常使用 MALDI-TOF 型、Q-TOF 型质谱仪等的精密质谱分析来确认原料药的分子量。另一方面，在血液药代动力学分析等的定量分析中，一般使用灵敏度高、动态范围大的三重四极杆质谱仪。

本文中为您介绍假定分析 siRNA 型核酸类药物的原料药，使用三重四极杆质谱仪 LCMS-8060 分析合成双链寡核苷酸的案例。确认了 SIM (Selected ion monitoring) 的定量性能。在使用 SIM 模式绘制标准曲线时，得到了 1 fmol ~ 10 pmol 范围内的线性。另外，多电荷离子通过解卷积分析确认了分子量。

M. Yamada

#### ■ 样品

序列：样品：双链寡核苷酸 (21nt)：  
AS-RNA, 5'-pU CGA AGU AUU CCG CGU ACG dTdT-3'  
Mw: 6646.0 (平均质量)  
SS-RNA, 5'-pC GUA CGC GGA AUA CUU CGA dTdT-3'  
Mw: 6669.0 (平均质量)

#### ■ 分析条件

HPLC 和 MS 的分析条件如表 1 所示。

表 1 分析条件

[HPLC 的条件] (Nexera™)	
色谱柱	: 市售 C18 色谱柱 (100 mm×2.1 mm I.D., 1.7 μm)
流动相	: A) 200 mM HFIP * 1 和 7.5 mM TEA * 2 / 水 B) 甲醇
梯度程序	: B 浓度 4 % (0 min) - 20 % (8.0 min)
流速	: 0.2 mL/min
柱温	: 75 °C
进样量	: 10 μL
[MS 的条件] (LCMS-8060)	
离子源	: 负离子模式
接口电压	: -3 kV
模式	: Q3 扫描 (m/z 500 - 1800) SIM m/z 1666.0 (SS), m/z 1659.9 (AS)
雾化气流速	: 3.0 L/min
干燥气流速	: 5.0 L/min
加热气流速	: 15.0 L/min
DL 温度	: 250 °C
加热模块温度	: 500 °C
接口温度	: 350 °C

#### ■ SIM 色谱图

SS-Oligo 和 AS-Oligo 各 100 fmol 的混合溶液的 SIM 色谱图如图 1 所示。使用离子对色谱法分别洗脱 6.88 分钟和 6.94 分钟，分离度 R 为 0.3。

图 2 所示为两种组分的质谱。在 AS-Oligo 和 SS-Oligo 中，均检测到 4 至 9 价多电荷离子。在 SIM 色谱图中选择了 4 电荷离子。

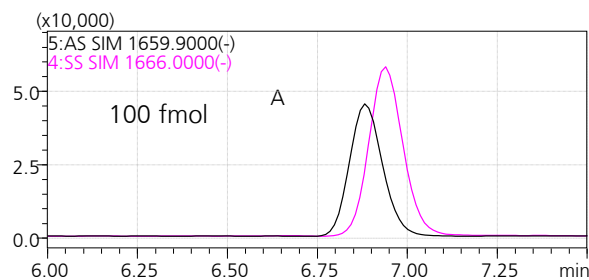


图 1 SIM 色谱图

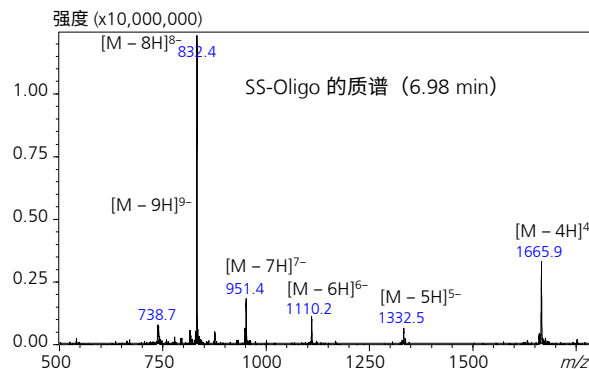
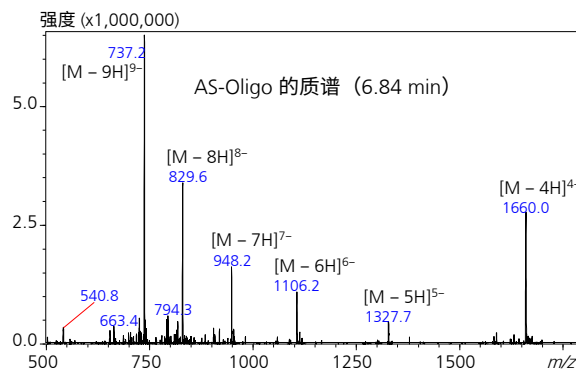


图 2 合成寡核苷酸的质谱

## ■ 标准曲线

在 1 fmol~10000 fmol 的范围内获得了 AS-Oligo 和 SS-Oligo 的标准曲线。进样量 1 fmol (检测极限) 和 5 fmol (定量下限) 下的 SIM 色谱图如图 3 所示。图 4 所示为标准曲线。AS-Oligo 的线性相关系数 ( $R^2$ ) 为 0.997, SS-Oligo 的线性相关系数为 0.995。也尝试使用 MRM (Multiple reaction monitoring) 进行尝试, 但定量下限为得到超过 SIM 的结果。在 MRM 中, 校准点 5 fmol 未检测到。作为参考, 图 5 所示为进样 50 fmol 时的 MRM 色谱图。

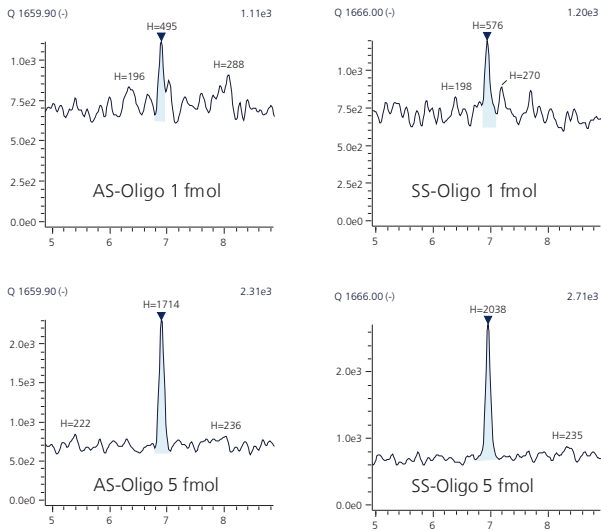


图 3 合成寡核苷酸的 SIM 色谱图 (H 为峰高)

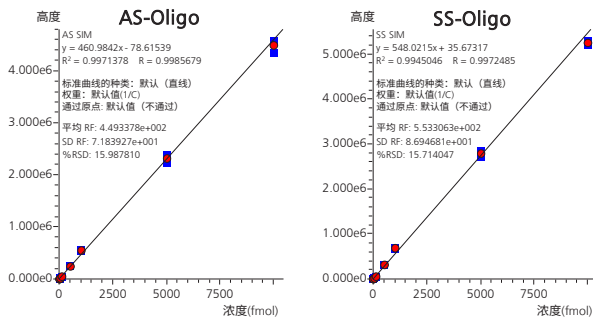


图 4 通过 SIM 色谱图得到的标准曲线

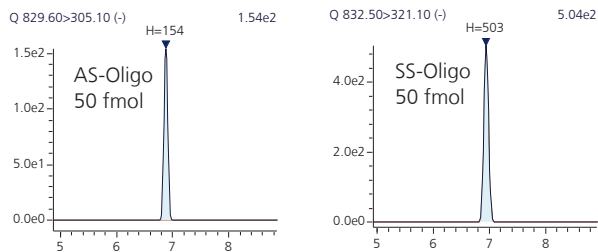


图 5 合成寡核苷酸的 MRM 色谱图 (H 为峰高)

## ■ 解卷积

通过软件 LabSolutions™ 的解卷积功能计算了分子量 (图 6)。如解卷积谱所示, AS-Oligo 和 SS-Oligo 的推测分子量为 6645.0 和 6667.2, 与平均分子量的误差为 1.0 Da 和 1.8 Da。

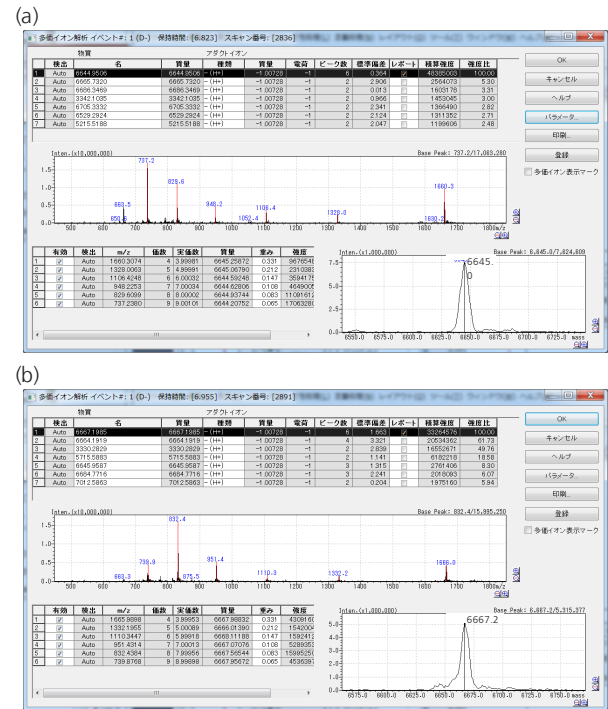


图 6 解卷积谱 (a) AS-Oligo、(b) SS-Oligo

## ■ 总结

本文介绍了使用 LCMS-8060 进行 siRNA 型寡核苷酸的 SIM 定量分析案例。在 1 fmol ~ 10 pmol 的范围内可以得到标准曲线。定量下限为 5 fmol, 进样 10  $\mu$ L 时的浓度约为 3 ng/mL。

在本次寡核苷酸测定得实验中, 与 MRM 模式相比, SIM 模式能够以更低的浓度绘制标准曲线。在 MRM 中, 将 8 电荷离子作为前体离子时, 可以得到强度最大的产物离子 (数据未刊载)。但是, MRM 的定量下限不及 SIM。判断原因是产物离子的绝对灵敏度不够。

通过四级杆型质谱仪得到的质谱分辨率较低, 但通过解卷积功能, 可以在几 Da 的误差范围内确认分子量。

岛津应用云



LCMS、Nexera 和 LabSolutions 是岛津制作所株式会社在日本与其他国家的商标。



岛津企业管理 (中国) 有限公司  
岛津 (香港) 有限公司

<http://www.shimadzu.com.cn>

用户服务热线电话: 800-810-0439  
400-650-0439

免责声明:

\* 本资料未经许可不得擅自修改、转载、销售;  
\* 本资料中的所有信息仅供参考, 不予任何保证。  
如有变动, 恕不另行通知。

第一版发行日: 2020 年 6 月