

LCMS 测定小干扰核苷酸 siRNA 分子量

LCMS-035

摘要： 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。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。

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		



LCMS-2050

SIMPLY EFFORTLESS

兼顾**小型化**和**高性能**

灵敏度 (S/N)	100: 1 (RMS)
<small>* Reserpine 1 µg</small>	
质量范围	<i>m/z</i> 2-2000
离子化单元	加热型ESI/APCI (DUIS™)
正负离子切换时间	10 msec
扫描速度	15,000 u/s

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., 3 μm)， 岛津（上海）
实验器材有限公司， P/N: 227-31073-01)

流 动 相： A相 -10 mM DIPEA + 25 mM HFIP + 10 μM EDTA， B相 - 乙腈

进样体积： 10 μL 流 速： 0.3 mL/min

柱 温： 55℃

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	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

Qarray 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。

■ 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。

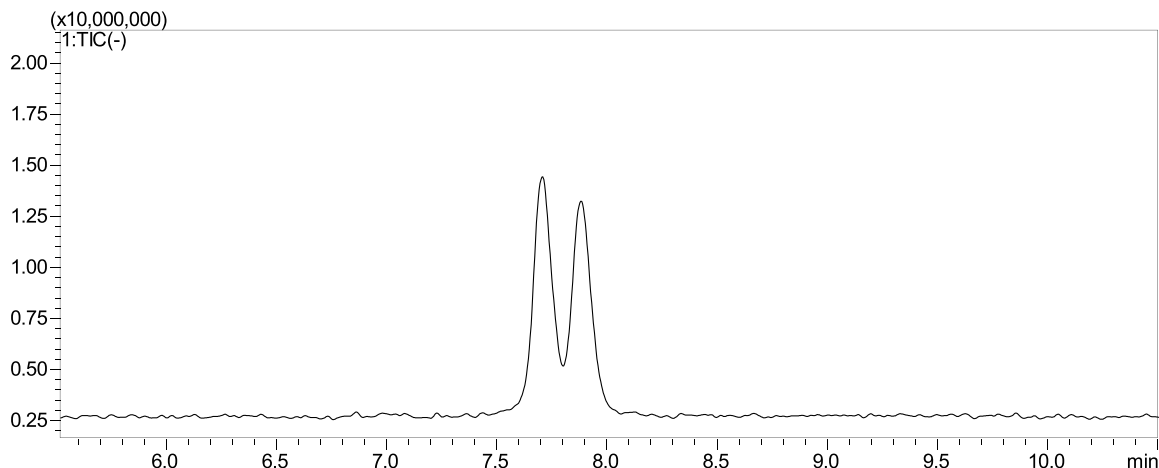


图 2 siRNA 总离子流图

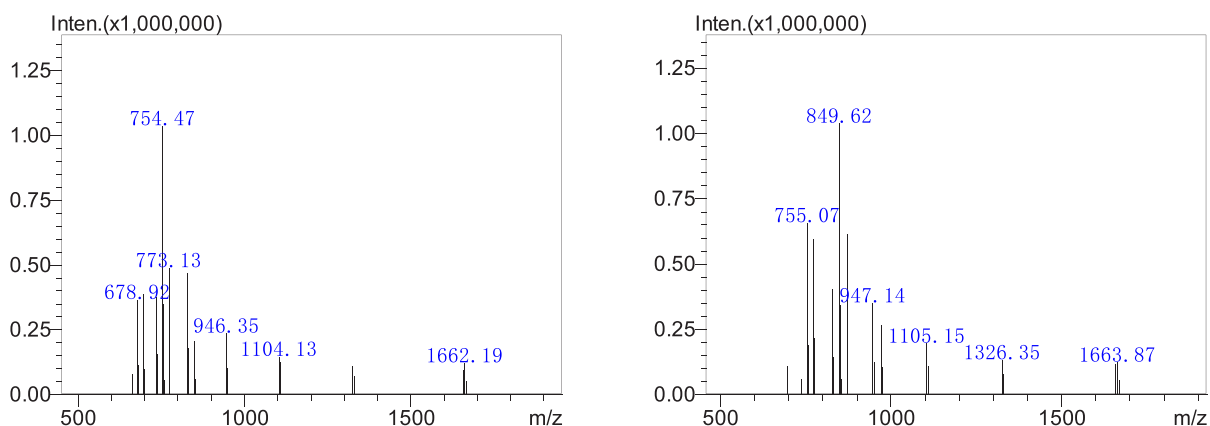


图3 siRNA 质谱图 (左图: 正义链; 右图: 反义链)

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。

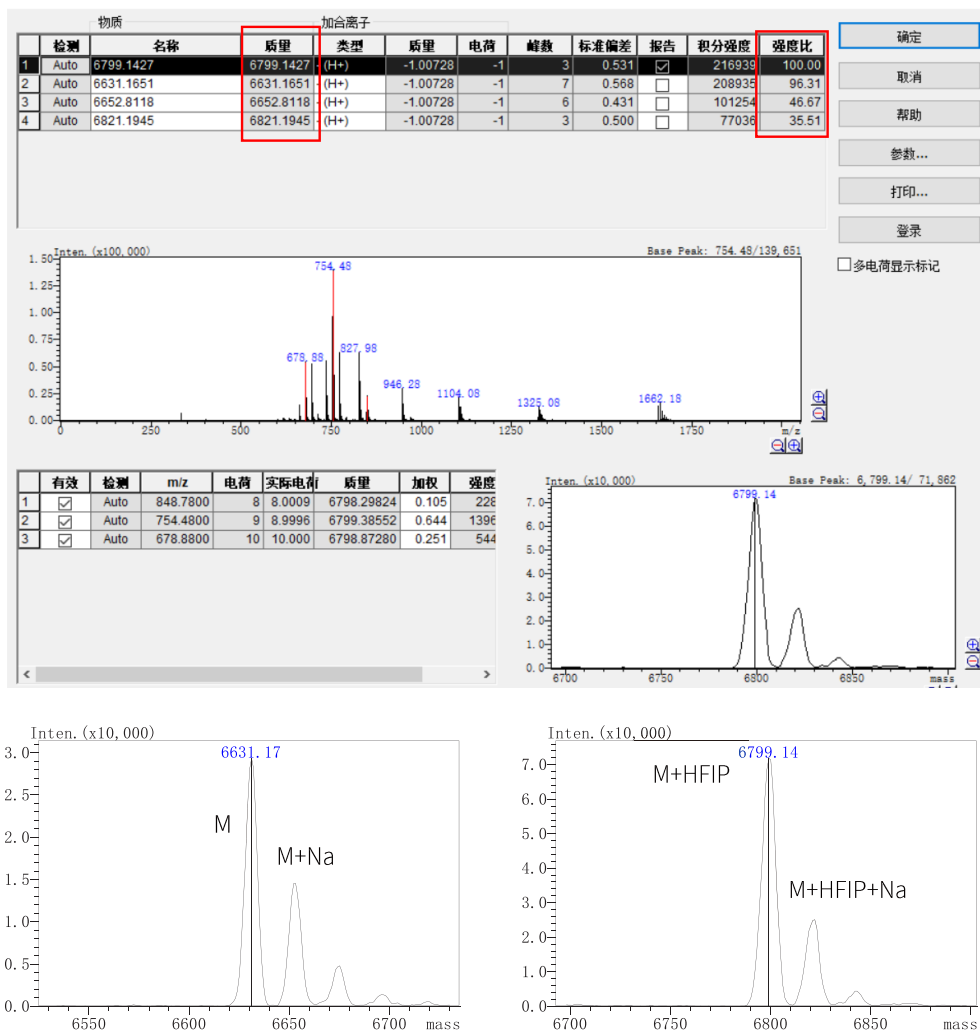


图4 siRNA 分子量解卷积结果

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 $\text{M}+\text{Na}$ 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。

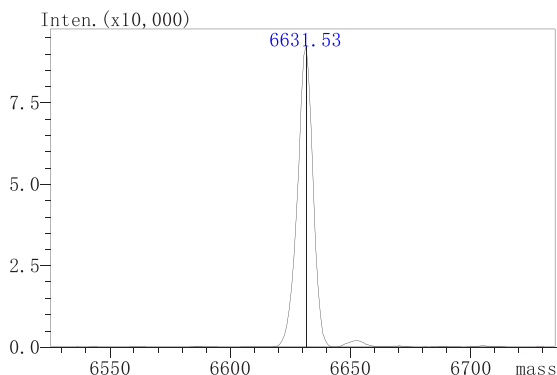


图 5 流动相加入 EDTA 后 siRNA 分子量解卷积结果

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。

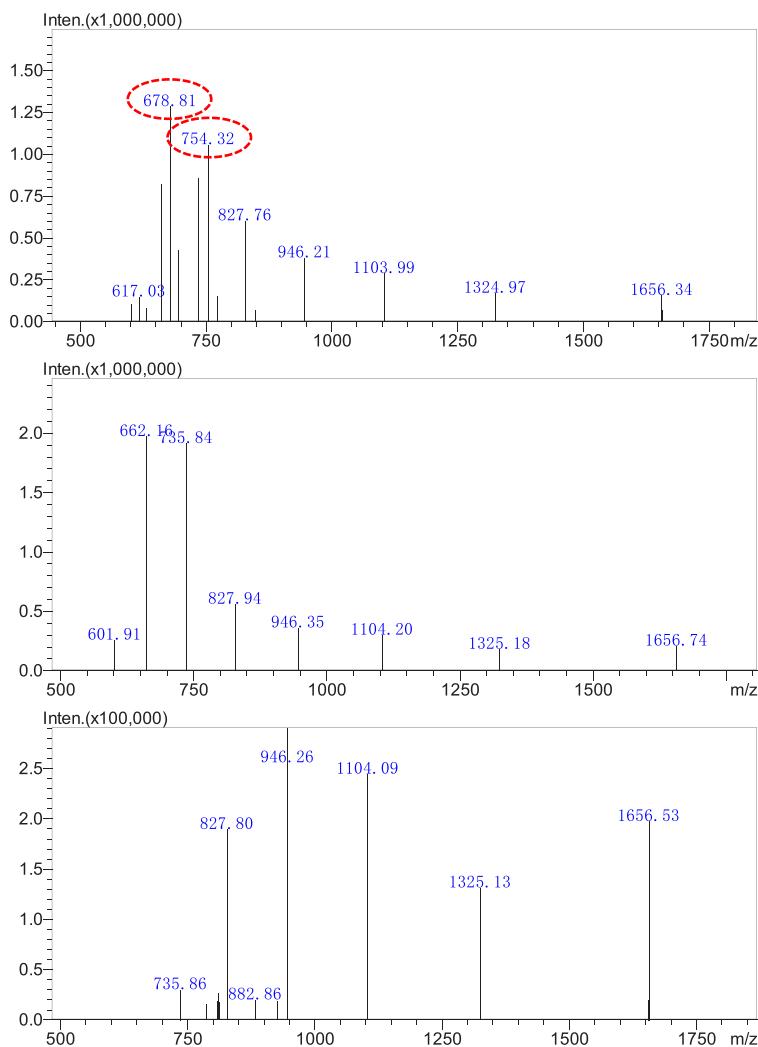


图 6 不同 Qarray 电压得到的 siRNA 质谱图 (上: -20 V, 中: -50 V, 下: -80 V)

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。

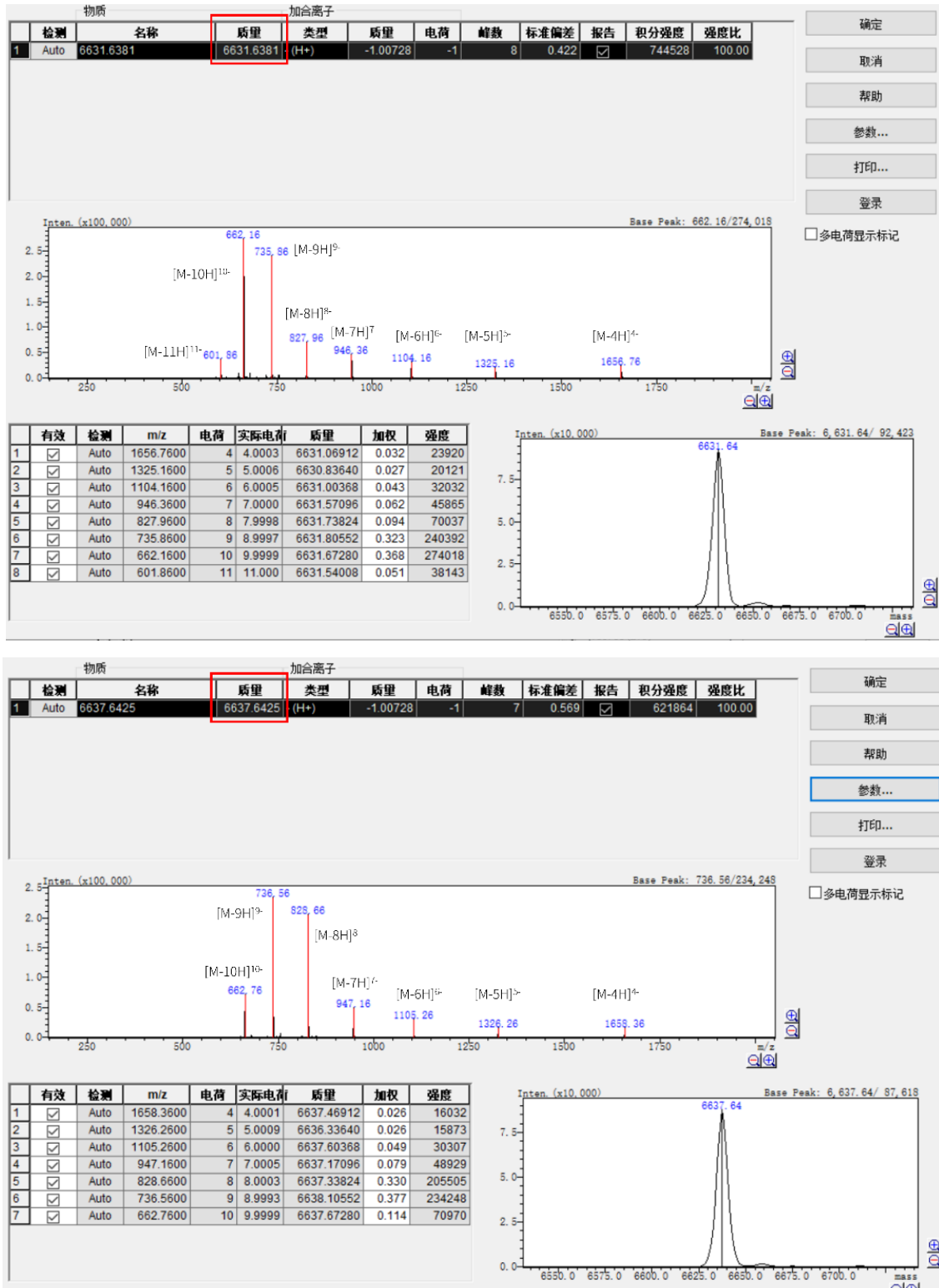


图 7 siRNA 正义链与反义链分子量解卷积结果

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 6638.03 Da，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	GUAACCAAGAGUAAUCCAUDdTdT	6638.03	6637.64	0.39

■ 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。

岛津应用云

