

# LCMS 测定反义寡核苷酸分子量

## LCMS-033

**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。

## ■ 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		



**LCMS-2050**

*SIMPLY EFFORTLESS*

兼顾**小型化**和**高性能**

灵敏度 (S/N)	100: 1 (RMS)
<small>* Reserpine 1 pg</small>	
质量范围	m/z 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)

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

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	Pumps	Pump B Conc.	95
7.1	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

DL 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。

## ■ 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。

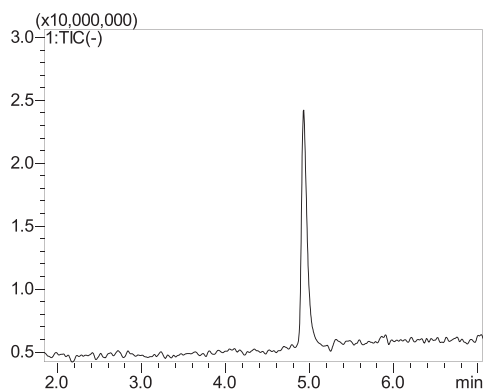


图 2 反义寡核苷酸总离子流图

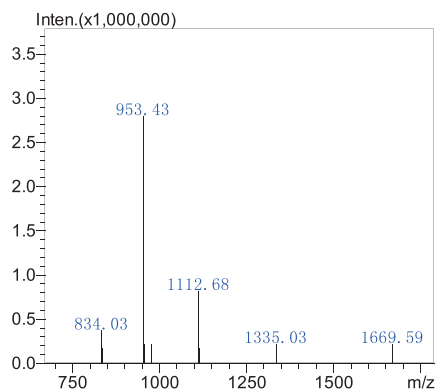


图 3 反义寡核苷酸质谱图

## 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。

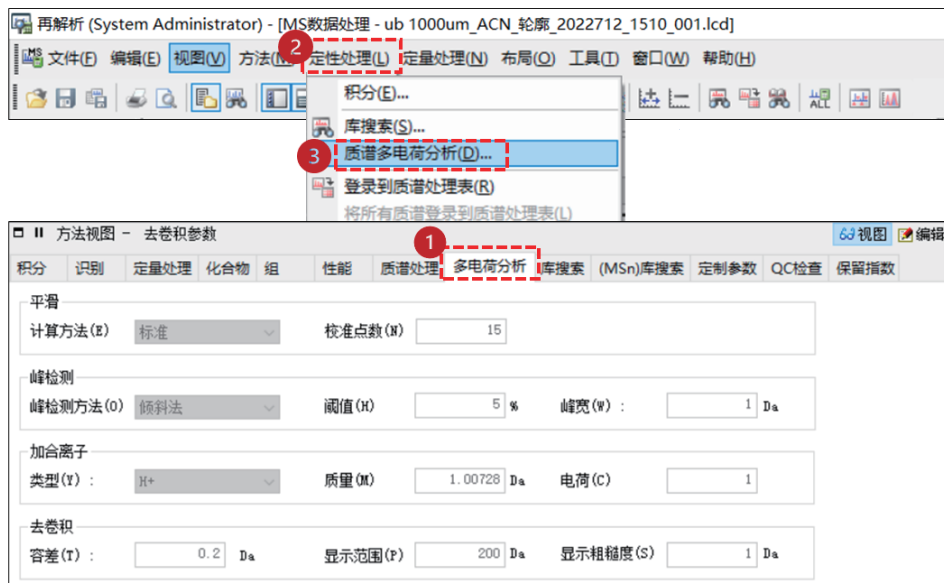


图 4 岛津 LabSolutions™ 的解卷积功能设置

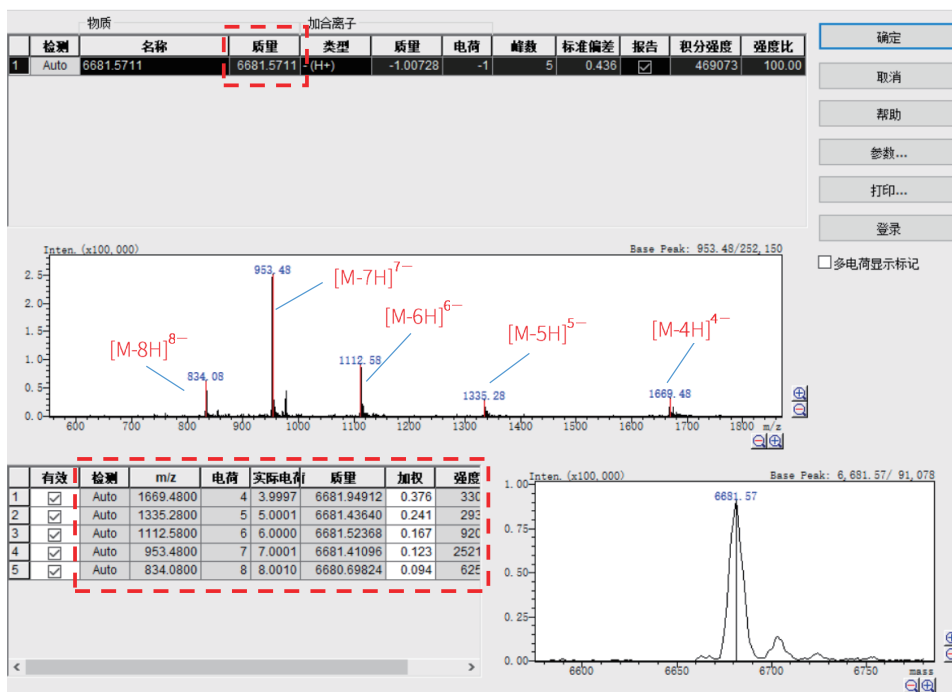


图 5 反义寡核苷酸分子量解卷积结果

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

## ■ 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。

岛津应用云

