

利用 MALDI-TOF-MS 分析寡核苷酸钠盐组分分布

MALDI-062

摘要：本文建立了一种基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱（MALDI-TOF-MS）分析寡核苷酸钠盐分布的方法。通过对单链寡核苷酸引物样品进行加钠处理，分别采用高效液相色谱-质谱（HPLC-MS）与 MALDI-TOF-MS 进行分析。结果表明，HPLC-MS 仅检测到未加盐的单一组分，而 MALDI-TOF-MS 能够清晰识别加钠后的钠盐分子，且加钠的数目从 0~19 不等，分布随加盐条件变化。该方法较 HPLC-MS 具有更高的灵敏度与适应性，能够有效检测寡核苷酸钠盐的分布特征。以反义寡核苷酸药物福米韦森钠为例，MALDI-TOF-MS 检测结果显示，福米韦森钠的主体钠盐形式为加合 0~3 个钠，且基质对检测结果无显著影响。该方法为寡核苷酸钠盐分布的定性分析提供了简便、灵敏的技术手段，对 ASO 药物的研发与质量控制具有重要应用价值。

关键词： MALDI-TOF-MS 寡核苷酸 寡核苷酸钠盐分布 定性分析

技术特点：

- ❖ MALDI-TOF 谱图可直接呈现寡核苷酸样品的钠盐组分分布，且不受样品中其他基质组分的影响；
- ❖ 相对于 LC-MS 检测方法，MALDI-TOF 法中样品可直接上样，前处理简单，分析速度快。

随着分子生物学技术的发展，核酸药物逐渐成为靶向性治疗的重要手段。与传统药物不同，核酸药物通过核苷酸序列调控细胞生物学功能，提供特异性和持久的治疗效果。常见的核酸药物包括反义寡核苷酸（ASO）、小干扰 RNA（siRNA）等。ASO 药物通常通过硫代磷酸盐或硼磷酸盐修饰，以提高其稳定性和生物利用度。药物成盐是一种常用的化学手段，能够改善药物的溶解性和吸收率，但这也对成盐形态的检测提出了挑战。

现有的分析技术，如液相色谱-质谱联用（LC-MS）、毛细管电泳（CE）及基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱（MALDI-TOF-MS），均可用于寡核苷酸药物的检测。然而，LC-MS 受限于离子对试剂

的使用，这类试剂不仅可能干扰质谱信号，还会影响对药物成盐状态的准确表征。此外，LC-MS 方法主要提供分子质量信息，难以解析不同盐形态（如钠盐）的分布特征。相比之下，MALDI-TOF-MS 作为一种“软电离”技术，能够有效规避离子对试剂的干扰，尤其适用于核酸药物成盐分布的分析。

本研究采用人工合成的单链寡核苷酸引物（20 bp）作为模型，通过乙酸钠醇沉加盐，并使用 HPLC-MS 与 MALDI-TOF-MS 分别进行分析。结果表明，MALDI-TOF-MS 在定性分析寡核苷酸钠盐分布方面具有显著优势，能够提供清晰的盐形态信息。该方法为 ASO 药物的合成与质量控制提供了可靠的技术支持。

■ 实验部分

1.1 仪器

1.1.1 岛津基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱仪 MALDI-8030

1.1.2 岛津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

输液泵：LC-40D XSi×2

柱温箱：CTO-40C

质谱仪：LCMS-2050

脱气机：DGU-405

自动进样器：SIL-40C XSi

检测器：SPD-M40

色谱工作站：LabSolutions Ver. 5.114

1.2 分析条件

1.2.1 MDLDI-TOF 质谱条件

调谐模式：	线性正离子模式	激光能量：	120
激光器：	355 nm 固态激光器	离子门阈值：	1000
扫描范围：	m/z 1000-10000	脉冲引出质量 (Da)：	寡核苷酸引物：6500 ASO 药物：7000

1.2.2 液相色谱条件

色谱柱：	Shim-pack GISS-HP C18 [Metal free column] (100 mm×2.1 mm., 1.9 μm; 岛津(上海)实验器材有限公司, P/N: 227-30922-02)		
流动相：	A相 -10mM DIPEA+25 mM HFIP, B相 - 乙腈		
流速：	0.3 mL/min	柱温：	50°C
进样体积：	0.1 μL		
洗脱方式：	梯度洗脱, 初始 B 相浓度为 5%, 时间程序见表 1。		

表 1 梯度洗脱程序

Time(min)	Module	Command	Value
5.00	Pumps	Pump B Conc.	40
5.10	Pumps	Pump B Conc.	90
7.00	Pumps	Pump B Conc.	90
7.10	Pumps	Pump B Conc.	5
10	Controller	Stop	

1.2.3 单四极杆质谱条件

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：	-30 V
加热气：	7.0 L/min	扫描模式：	SCAN (-)
D L 温度：	250°C	扫描范围：	400-2000

1.3 样品前处理

基质配制：5 mg 柠檬酸氢二铵溶于 1 mL 70% 的 ACN 水溶液，涡旋至溶解，加入 45 mg 3-羟基-2-吡啶甲酸 (3-HPA)，涡旋超声 5min 至溶解。

寡核苷酸引物及福米韦森成盐钠的配制：样品离心后，加入纯水配制成 100 μM 的溶液，涡旋溶解。加盐实验时，离心管中加入 100 μL 引物溶液，再立即加入 10 μL 3 M 的乙酸钠溶液，涡旋混匀。分别等待 0/15/30/45/60 min, 加入 -20°C 预冷的无水乙醇 200 μL, 涡旋混匀, 立即放入 -20°C 环境分别等待 0.5/1/1.5/2 h, 取出后在 4°C, 12000 rpm 条件下离心 15 min, 在低温环境下迅速弃去上清。最后用 40 μL 纯水溶解沉淀，涡旋混匀。

福米韦森钠制剂基质配置：取福米韦森钠冻干粉，加二甲基亚砜 (DMSO) 配制成 10 mg/mL 母液；随后取 50 μL 福米韦森钠母液，依次加入 200 μL 聚乙二醇 300 (PEG300, 0.1mg/ml)、25 μL 吐温 -80 (Tween-80) 以及 725 μL 纯水混匀。

■ 结果与讨论

2.1 不同手段分析寡核苷酸样品结果

分别使用 MALDI-8030 和 LCMS-2050 对未加盐寡核苷酸样品与加盐后寡核苷酸样品进行检测。结果如图 1 所示，对于未加盐寡核苷酸样品，使用 MALDI 正离子模式进行扫描，得到质量数为 6072.09（理论质量数 6072.02）的单一组分峰 $[M+H]^+$ （图 1a）；LC-MS 在复合离子源（DUIS）下进行负离子扫描，得到多电荷质谱结果（图 1c），在对质谱图进行多电荷解卷积分析后得到质量数 6069.9（理论质量数 6071.02）的分子量结果（图 1c'）。

对于加盐后寡核苷酸样品，MALDI-TOF-MS 显示出一系列峰（图 1b），最左侧质量数为 6071.89（理论质量数 6072.02），相邻两峰间理论质量数差为 21.99（加氢离子峰和加钠离子峰的质量差）；最右侧可识别峰质量数为 6425.02（理论质量数 6423.86），计算得能够测出的加钠范围为 0-16 个钠离子，最高峰质量数 6205.33（理论质量数 6203.96），计算得加合了 6 个钠离子，故而该加钠条件下占比最多的寡核苷酸钠盐加合有 6 个钠离子，证明了该方法能够较为准确地定性寡核苷酸钠盐的分布，包括加钠个数范围，最高峰等信息。LC-MS 的结果与未加盐几乎相同（图 1d），在对质谱图进行多电荷解卷积分析后，只显示了质量数 6069.8（理论质量数 6071.02）的分子量结果（图 1d'），此结果表明 LC-MS 无法测定寡核苷酸钠盐分布。

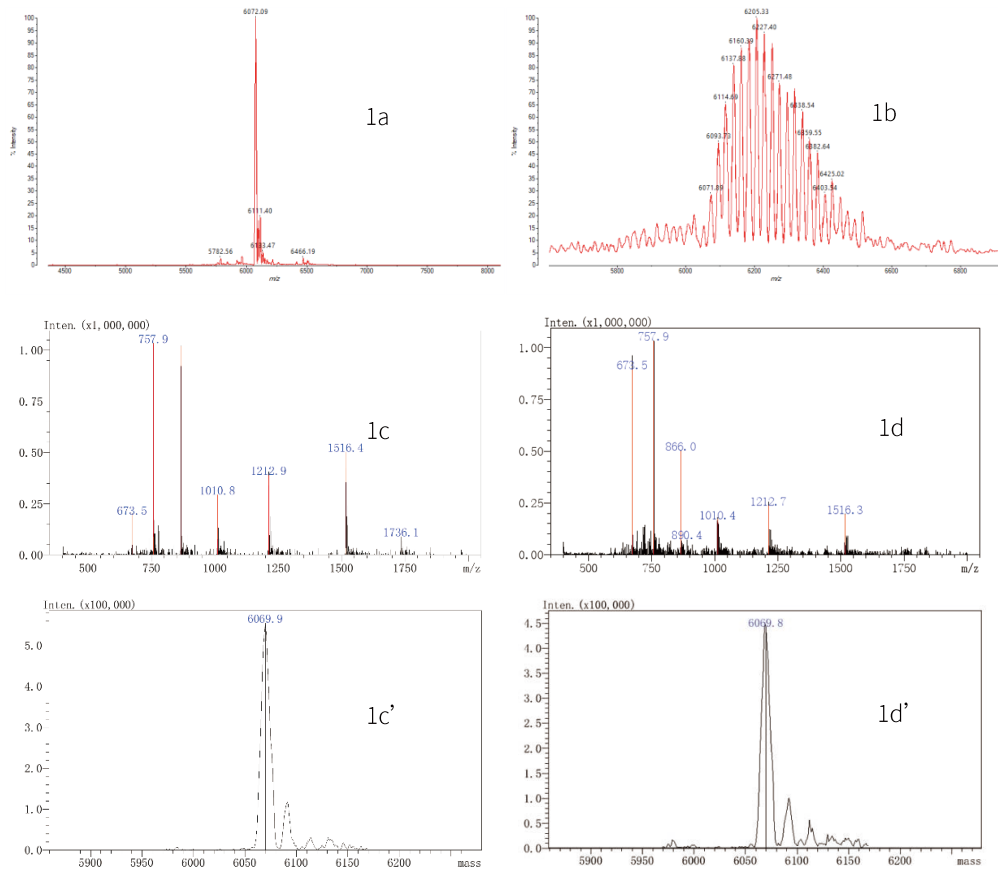


图 1 MALDI-TOF-MS 与 LC-MS 测量未加盐与加盐后寡核苷酸样品的质谱图

1a: MALDI-TOF-MS 测量未加盐寡核苷酸样品；1b: MALDI-TOF-MS 测量加盐后寡核苷酸样品；

1c: LC-MS 测量未加盐寡核苷酸样品；1d: LC-MS 测量加盐后寡核苷酸样品；

1c': 图 1c 对应的多电荷解卷积结果；1d': 图 1d 对应的多电荷解卷积结果

2.2 利用 MALDI-TOF-MS 技术监控寡核苷酸钠盐成盐情况

本研究的加盐过程主要包含以下几个步骤：加入乙酸钠、醇沉、溶解沉淀。每个过程的参数不同，都会影响到最终的加盐情况，基于 2.1 部分的实验结果，选择利用 MALDI-TOF-MS 技术进行检测、对比，得到不同情况下加盐分布情况的变化趋势与拐点。

2.2.1 加入乙酸钠后反应时间的影响

对 5 份未加盐引物样品作加盐处理，控制乙酸钠反应时间不同：加入乙酸钠后分别等待反应 0/15/30/45/60 min，醇沉时间为 1 h，使用纯水溶解沉淀，上样使用 MALDI-TOF-MS 检测。表 2 及图 2 显示了具体检测情况及图像。对不同组的样品检测结果进行对比，MALDI-TOF-MS 显示出了清晰的趋势：最低加钠数都为 0，即都存在没有加钠的纯寡核苷酸离子峰 $[M+H]^+$ 。随着乙酸钠反应时间的增加，最高加钠数和含量最大的分子加钠数均呈现先增大后减小的趋势；在 45 分钟时，这些指标达到了最优状态：加钠数量上限最高（13）、范围最广（0-13）以及最高峰加钠数最大（3）。因此，为了达到最显著的加钠效果，后续实验选择 45 分钟作为最佳反应时间条件。

表 2 不同乙酸钠反应时间下引物的 MALDI-TOF 检测结果

样品编号	反应时间 (min)	最低质量数离子峰 (Da)	最高质量数离子峰 (Da)	可识别加钠数量范围	最高峰加钠数
1	0	6071.689	6158.010	0-4	0
2	15	6071.326	6290.021	0-10	1
3	30	6071.508	6311.139	0-11	2
4	45	6072.599	6359.436	0-13	3
5	60	6072.235	6248.998	0-8	1

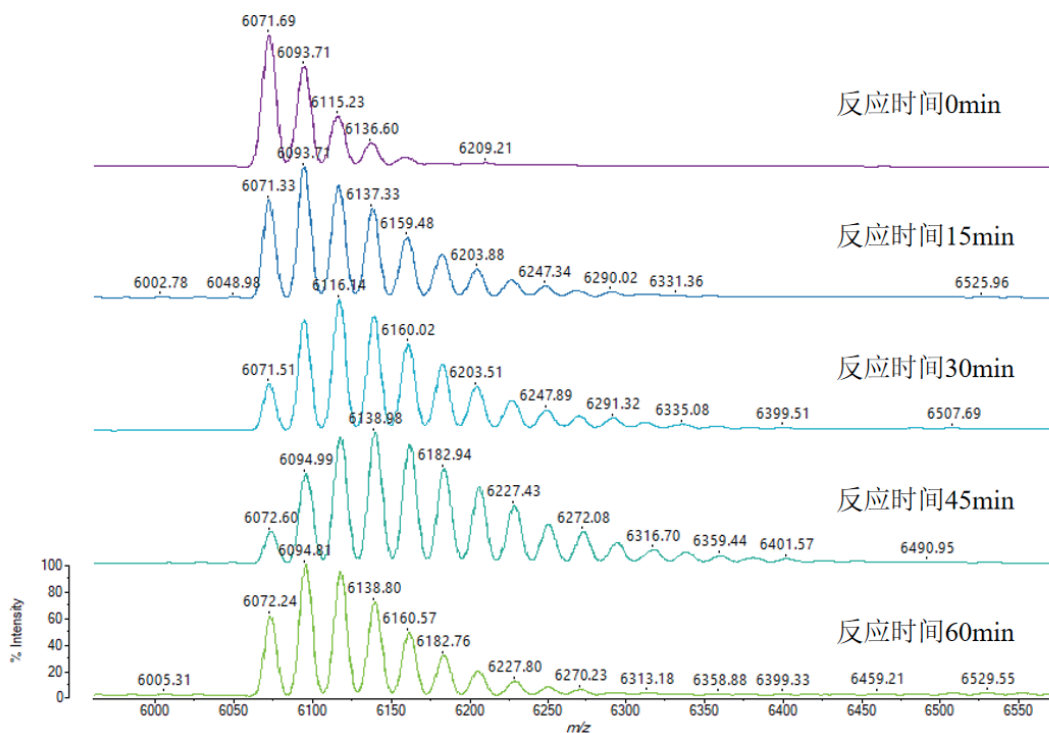


图 2 不同乙酸钠反应时间下的 MALDI-TOF 质谱图

2.2.2 醇沉时间的影响

对4份未加盐样品作加盐处理，控制醇沉时间不同：加入乙酸钠后等待反应45 min，醇沉时间为0.5/1/1.5/2 h，使用纯水溶解沉淀，上样使用MALDI-TOF-MS检测。表3及图3显示了具体检测情况及图像。与之前类似，MALDI-TOF-MS同样显示出了清晰的加钠分布变化规律，体现在最低加钠数都为0，即都存在没有加钠的纯寡核苷酸离子；最高加钠数虽然在可识别的数字上先不变后增加，但根据色谱图，第二、三编号组（醇沉时间1 h、1.5 h）后有数个较明显的加钠峰，但没有能够识别，因此从实际上说，第二组可识别加钠数量范围应当大于11，而第三组可识别加钠数量范围也应当大于16，故而推断最高加钠数在1.5 h前升高，1.5 h后几乎保持不变，维持在19左右，而最高峰加钠数随醇沉时间延长而先增大后减小，最大值出现在1.5 h。

因此综合判断，加钠程度的拐点出现在醇沉时间1.5 h组，其加钠数量上限（19左右）、范围（1-19左右）、最高峰加钠数（6）均不低于其他组别，显示1.5 h是一个可以使加钠反应较为充分的时间，因此后续实验固定醇沉时间1.5 h。醇沉时间1.5 h前，整体趋势为醇沉时间越长，加钠程度越高；1.5 h后，反而加钠程度随着醇沉时间延长而下降，表现为最大加钠数几乎不变而最高峰加钠数减小，整体质谱图呈现左移趋势。

表3 不同醇沉时间下引物的MALDI-TOF检测结果

样品编号	醇沉时间 (h)	最低质量数离子峰 (Da)	最高质量数离子峰 (Da)	可识别加钠数量范围	最高峰加钠数
1	0.5	6072.78	6316.15	0-11	2
2	1.0	6071.35	6312.57	0-11	2
3	1.5	6071.89	6425.02	0-16	6
4	2.0	6071.56	6488.19	0-19	4

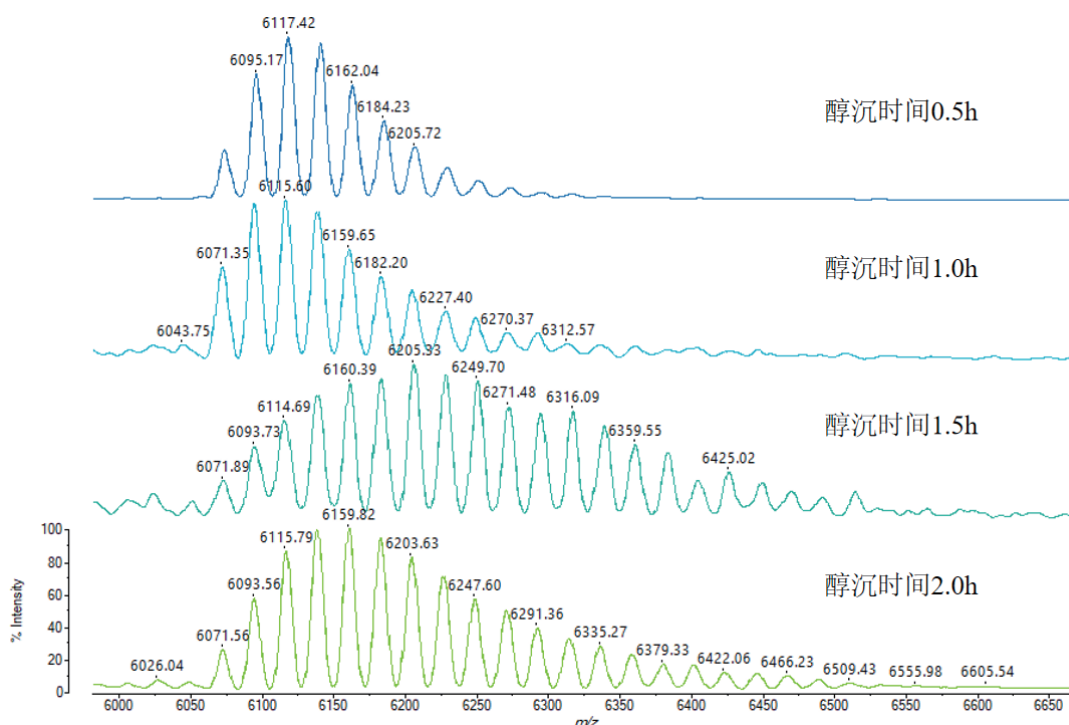


图3 不同醇沉时间下引物的MALDI-TOF-MS质谱图

2.3 实际样品测定

2.3.1 实际样品初步测定

使用 MALDI-TOF-MS 分析福米韦森钠样品溶液，条件与上述一致。所呈现的质谱图如图 4 所示。其主峰的首个质谱峰位于 $m/z=6683.51$ 处（理论为 6683.44），最后端的质谱峰位于 $m/z=6748.12$ 处（理论为 6749.38），显示福米韦森钠在该条件水溶液下的存在形式为加合 0 - 4 个钠。质谱图主峰形态呈现由左至右逐步下降的过程，其中不加钠的形态存在最多，显示在该溶剂（纯水）、该浓度（100 μM ）条件下，福米韦森钠的最主要存在形式为不加钠，且绝大部分形态为加合 0-4 个钠。

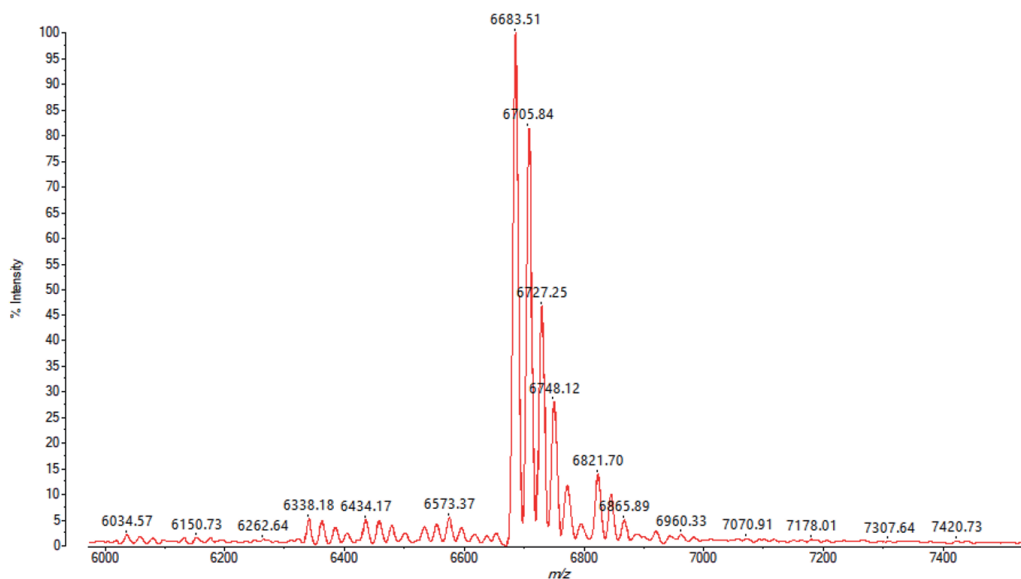


图 4 福米韦森钠的 MALDI-TOF 质谱图

2.3.2 药物基质影响

根据 InvivoChem 公司提供的动物实验注射制剂的配制方案^[1]，进行基于 PEG300 和吐温 -80 的寡核苷酸药物基质配制，其溶剂为 DMSO，纯水，辅剂为 PEG300、吐温 -80。其中 PEG300 具有增加药物溶解性等作用；吐温 -80 作为表面活性剂，避免细菌繁殖，同时促进各溶质均匀分散。

图 5 显示了当基质存在时，福米韦森钠样品的整体质谱图形态，画面中部和右部采用了局部放大处理。可以较为清晰地观察到左侧 PEG300、中部吐温 -80、右侧福米韦森钠三种组分的检测情况。

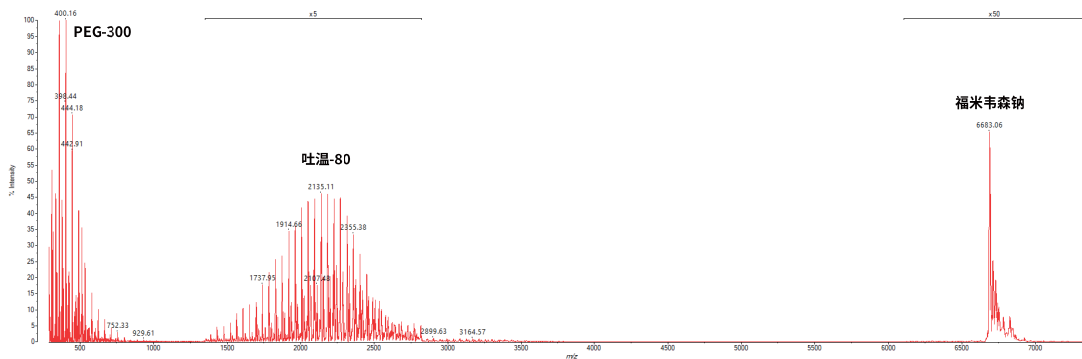


图 5 福米韦森钠与基质混合物的 MALDI-TOF 质谱图

图 6 展示了加入基质前后的福米韦森钠 MALDI-TOF 质谱图。其中图 6a 与图 4 相同，图 6b 是图 5 右侧福米韦森钠部分的放大图。可以观察到，两者形态极为相似，主体均为从 m/z 6683 左右到 m/z 6749 左右的四个峰，且峰面积变化趋势相同。从质谱图形态上，加入基质没有对福米韦森钠的形态检验造成影响，显示了以加合 0-3 个钠为主体的组分。

在检验精度方面，表 4 展示了加入基质后 0-3 个钠组分的检验误差在 ± 0.5 Da 内，展现了该方法对于加入基质的福米韦森钠药物制剂同样具有较高精度的检测能力，并未受到基质影响。

因此，对于实际样本检验，该方法并不会受到药物基质影响。该方法在清晰地反映基质与药物各组分的同时，保证了对寡核苷酸钠盐组分检验的精确性，可以运用于药物原料与制剂的检验中。

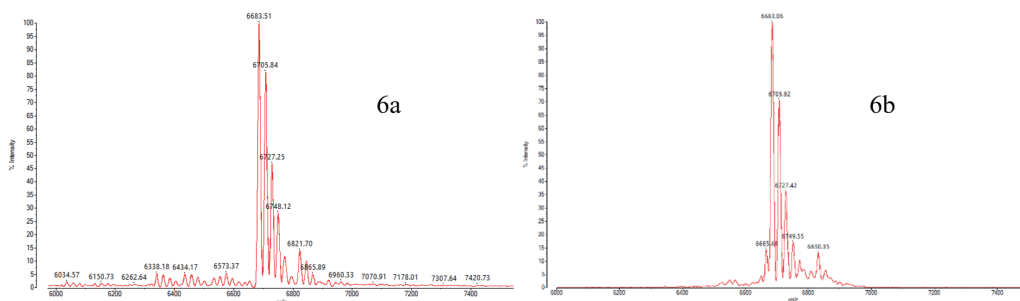


图 6 加入基质前后的福米韦森钠 MALDI-TOF 质谱图
6a: 无基质的福米韦森钠质谱图；6b: 有基质的福米韦森钠质谱图

表 4 加入基质前后福米韦森钠的 MALDI-TOF 检测结果

理论加钠数	理论分子量 (Da)	无基质分子量 (Da)	有基质分子量 (Da)	有基质时测量误差 (Da)
0	6683.44	6683.51	6683.06	-0.38
1	6705.43	6705.84	6705.92	0.49
2	6727.42	6727.25	6727.42	0
3	6749.41	6748.12	6749.55	0.14

综上所述，与 LC-MS 方法相比，MALDI-TOF-MS 能直观呈现寡核苷酸钠盐分布情况，同时能精确反应不同条件下的加盐分布变化趋势，在实际样品测定中也能清晰反映相关药物在溶剂中的成盐分布。针对有基质的药物制剂，该方法不受药物基质的干扰，能够保证对寡核苷酸钠盐组分的检验精确性，对辅助寡核苷酸药物的生产、检验等过程有一定意义。

■ 结论

本研究建立了分析寡核苷酸钠盐分布情况的 MALDI-TOF-MS 方法。本方法前处理简单高效，响应范围广，精确度高，可进行高通量分析，且不受药物基质影响，在寡核苷酸钠盐分布检验方面有独特优越性，为寡核苷酸药物的生产、检验等过程提供了可靠的技术手段。

参考文献

[1] Invivochem. Fomivirsen sodium. [2024-08-26]. <https://www.invivochem.cn/fomivirsen-sodium.html>

岛津应用云

