

# LCMS 快速分离反义寡核苷酸及其杂质并测定其分子量

LCMS-054

**摘要：** 本文使用生物惰性超高效液相色谱仪 Nexera XS inert 与单四极杆质谱 LCMS-2050 联用，快速分离反义寡核苷酸（ASO）及其杂质，并测定分子量信息。通过优化流动相，2 min 内将 ASO 主成分及杂质分离，通过多电荷解卷积测定 ASO 主成分和杂质的分子量，从而推断杂质类型。

**关键词：** ASO 杂质分离 分子量 质谱多电荷分析

## 技术特点：

- ❖ 2 min 内将 ASO 主成分与杂质分离，实现快速分析。
- ❖ 通过 LabSolutions 软件多电荷解卷积功能计算 ASO 主成分和杂质分子量，推断可能的杂质。

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。

绝大部分寡核苷酸药物是利用自动化设备通过固相亚磷酸胺化学法来进行合成。该方法是指将核酸固定在固相载体上，通过脱保护、偶联、氧化和加帽四

步循环，每个循环连接上一个新的核苷酸，直至寡核苷酸链延伸至所需长度。由于寡核苷酸固相合成过程中，每步反应的效率不能达到 100%，所以在寡核苷酸药物中，会存在部分 n-1、n-2、n+1 或 n+2 等杂质。

为了测定寡核苷酸药物纯度，提高分析效率，本文通过优化流动相，实现快速将 ASO 主成分与杂质分离，并通过 LCMS-2050 采集质谱图，结合岛津 LabSolutions 软件的“质谱多电荷分析”功能进行解卷积分析，可以计算得到分子量信息，用于推断可能的杂质信息。

## ■ 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	检测器：	SPD-M40
质谱仪：	LCMS-2050	色谱工作站：	LabSolutions Ver. 5.114

### 1.2 分析条件

色谱柱：	C18 (50 mm×2.1 mm I.D., 1.7 μm)		
流动相：	A 相 -10 mM DIPEA+25 mM HFIP, B 相 -A 相:乙腈=1:1(V/V)		
进样体积：	10 μL	流速：	0.5 mL/min
柱温：	55°C		
洗脱方式：	等度洗脱, B 相比例为 13%		

### 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 (-)
DL 温度：250°C	扫描范围：50~2000

### 1.3 样品前处理方法

将 ASO 用水稀释至 100 µg/mL。

## ■ 结果与讨论

### 2.1 反义寡核苷酸样品色谱图

2 min 内完成 ASO 样品主成分和杂质的分离，9# 主成分峰与前后杂质峰的分度分别为 1.54 和 1.90，分离度良好。通过紫外色谱图计算得到主成分的百分含量为 64.6%。

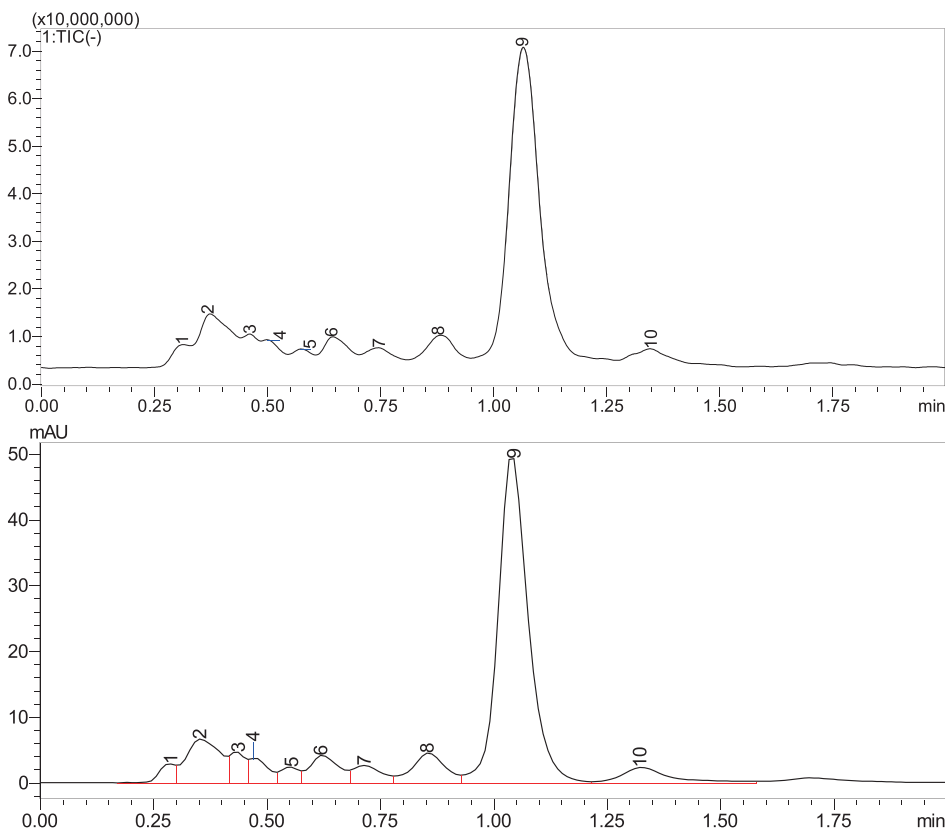


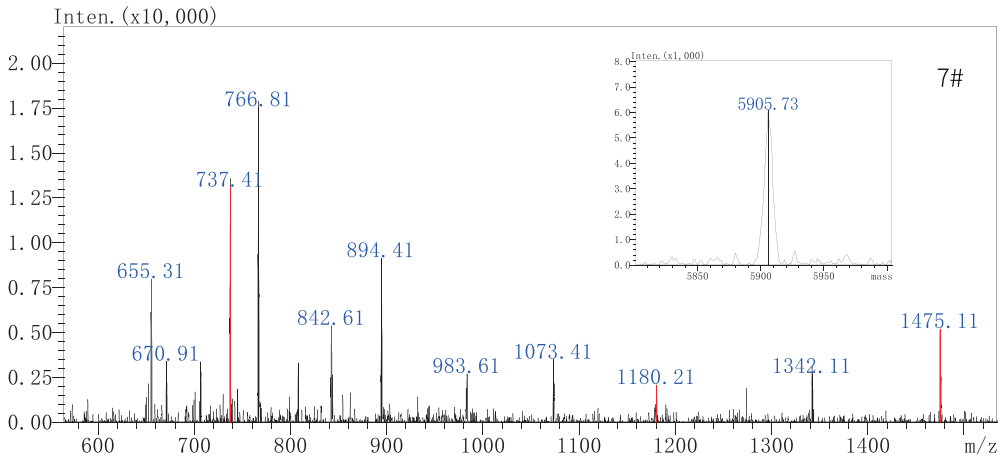
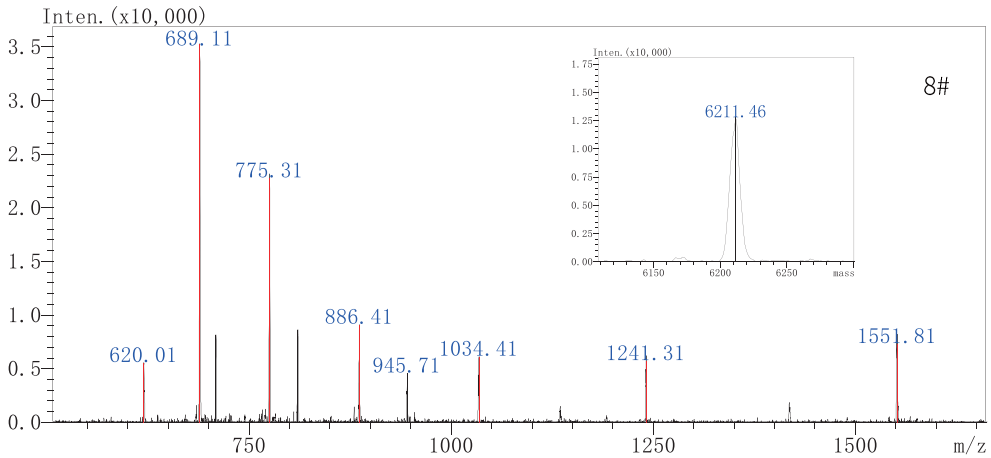
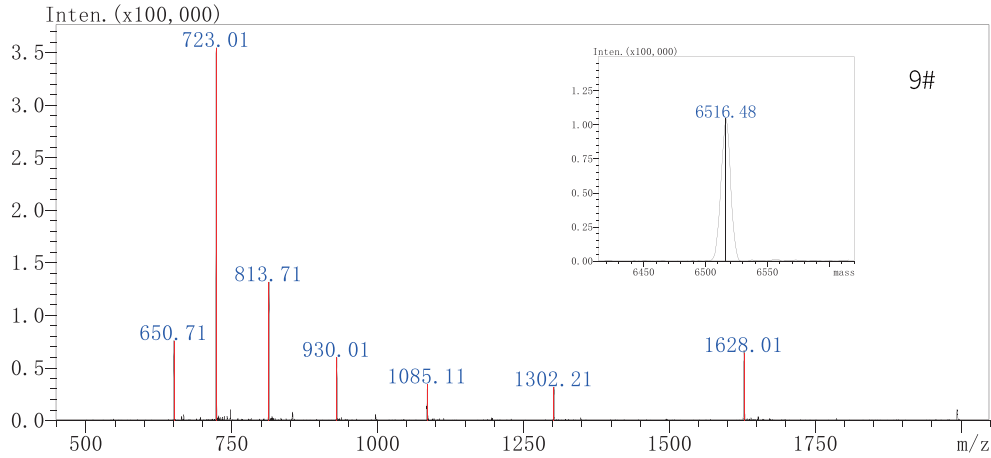
图 1 反义寡核苷酸色谱图（上图：质谱总离子流图；下图：紫外色谱图）

### 2.2 反义寡核苷酸样品质谱图及分子量解卷积结果

通过 LabSolutions 软件自带的多电荷解卷积功能对质谱图进行分析，可以得到分子量信息。主峰及前后杂质峰对应质谱图及分子量解卷积结果如图 2 所示。根据各峰间分子量的差值可推断杂质峰可能丢失核苷酸及个

数，其中主峰分子量为 6516.48 Da，8# 杂质峰分子量为 6211.46 Da，与主峰分子量相差 305.02 Da，推断可能丢失一个胞嘧啶核苷酸（CMP）。7# 杂质峰分子量为 5905.73 Da，与 8# 杂质峰分子量相差 305.73 Da，推断可能丢失一个胞嘧啶核苷酸（CMP）或尿嘧啶核苷酸（UMP）。其他杂质峰分子量解卷积结果见表 1。

注：核苷酸缩合时失去 1 分子水，CMP 和 UMP 信息请见文末附录



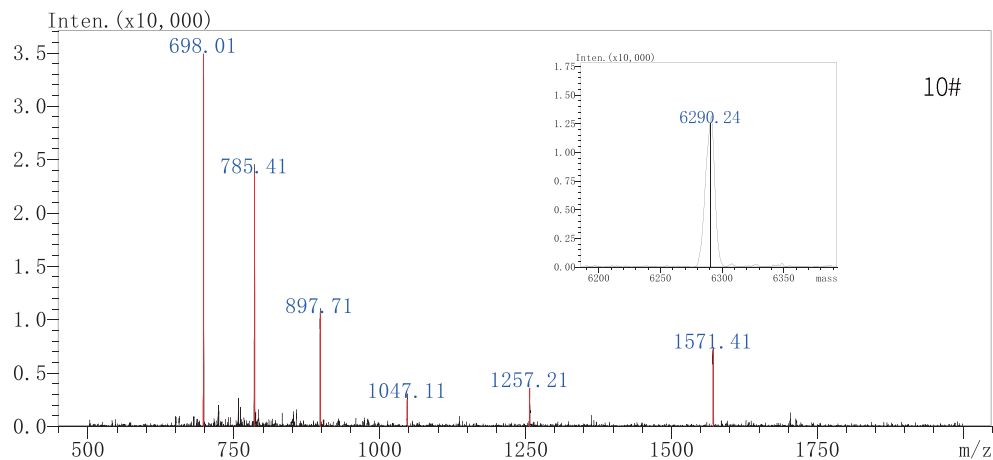


图 2 9# 主成分峰及其前后杂质对应质谱图及分子量解卷积结果

表 1 反义寡核苷酸主成分及杂质分子量汇总表

峰号	分子量 (Da)	峰号	分子量 (Da)
1	/	6	5028.11, 5600.49
2	/	7	5905.73
3	4072.17	8	6211.46
4	4377.72	9	6516.48
5	4723.90	10	6290.24

## ■ 结论

本文使用生物惰性超高效液相色谱仪 Nexera XS inert 与单四极杆质谱 LCMS-2050 联用，分离 ASO 样品主成分和杂质，并测定其分子量。通过方法优化，2 min 内完成主成分和杂质的分离，计算得到主成分含量，同时通过 LabSolutions 软件自带解卷积功能计算得到分子量信息，推断可能的杂质。

附录：

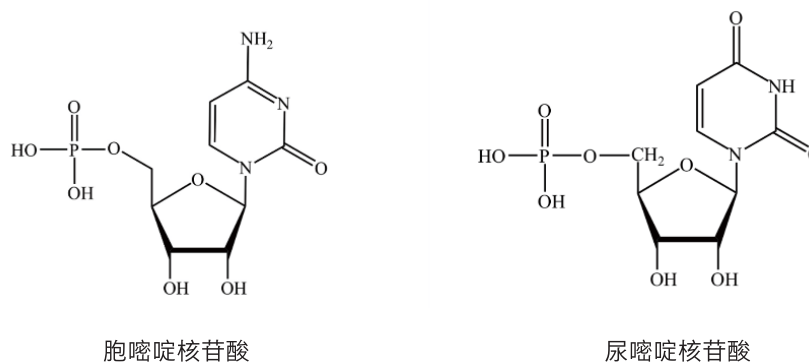


图 3 两种核苷酸结构式

表 2 两种核苷酸信息表

化合物名	CAS	缩写	分子式	分子量	残基分子量
胞嘧啶核苷酸	63-37-6	CMP	$C_9H_{14}N_3O_8P$	323.2	305.2
尿嘧啶核苷酸	58-97-9	UMP	$C_9H_{13}N_2O_9P$	324.2	306.2

岛津应用云

