

SCIEX Triple Quad™ 6500+系统定量测定大鼠血浆中核酸类药物

Quantitative Analysis of the Oligonucleotides in Rat Plasma by SCIEX Triple Quad™ 6500+ System

雷敏, 龙志敏, 郭立海

Lei Min, Long Zhimin, Guo Lihai

SCIEX, 中国

Keywords: Quantitation, Oligonucleotides, SCIEX Triple Quad™ 6500+ System

引言

近年来,核酸药物已成为全球研发和投资的重点领域。相较于在蛋白层面进行疾病干预的传统药物,核酸药物能在遗传信息传递源头发挥作用,因此具有特异性强、基因靶点丰富、疗效持久等优点,有望开启继小分子药物和抗体药物之后的第三代药物浪潮。而核酸药物因其结构特点,在生物体内具有吸收度低、半衰期短等特点,为体内样本药代动力学定量工作带来极大的挑战,因此,对于仪器的专属性、灵敏度和稳定性以及生物样本前处理流程也带来巨大的挑战。本方案基于LC-MS/MS的液质方法及SPE固相萃取前处理方法,建立专属性高、灵敏度高、稳定性好的方法,为核酸药物定量研究工作提供方法参考。

本文中实验方法特点

本方法采用Phenomenex Clarity® OTX 25mg 96孔固相萃取板前处理方法对血浆样品进行前处理,通过SCIEX Triple Quad™ 6500+系统对大鼠血浆中的核酸药物进行定量,方法特点如下:

1. 使用SCIEX Triple Quad™ 6500+ 系统,结合Phenomenex EVO-C18 色谱柱,建立7 min 色谱梯度,能够实现高通量定量分析。
2. 方法灵敏度高(血浆中定量下限LOQ: 0.5 ng/mL);血浆线性范围广(0.5~500 ng/mL);低浓度重现性好(RSD < 10%),表明仪器和方法重现性好。

3. 该方案中采用Phenomenex Clarity® OTX 25mg 96孔固相萃取板对血浆样本进行前处理提取,对该方案中的核酸药物建立相应的前处理流程,低、中、高不同浓度提取回收率在52~58%,基质效应在74-85%;前处理条件简单易操作。
4. 该方案中包含核酸药物的液质条件和血浆样本的前处理提取方法,为核酸类药物在生物样本中的定量研究工作提供LC-MS/MS方法和前处理提取方法两方面的参考。

实验方法

1. 样品信息

该方案中核酸化合物为定制合成的核酸药物,且分子量经SCIEX X500R 系统定性确认后,分子量为6987.3,该化合物以Oligo命名。

2. 样本制备

血浆样本前处理流程如下:

步骤	溶剂
样品预处理	200 µl 血浆样品+200 µl 裂解液, 涡旋混匀
活化SPE小柱	甲醇, 1ml × 2
平衡SPE小柱	50 mM 醋酸铵 (调pH至5.5), 1ml × 2
上样	0.4 ml 预处理样品
淋洗	50 mM 醋酸铵 (调pH至5.5) :50% 乙腈=1:1 (1ml × 4)
洗脱	100 mM NH ₄ HCO ₃ (pH=9.5) :ACN:THF=5:4:1
吹干复溶	100 µl TE Buffer

其中：裂解液：Clarity OTX Lysis-Loading Buffer（Phenomenex，货号：AL0-8579）；Clarity® OTX 25mg 96孔固相萃取板：Clarity OTX 25mg/Well（Phenomenex，货号：8E-S103-CGA）；TE Buffer 溶液（pH约 8.26）：1M Tris•HCl（pH=8.0）0.5ml +100 mmol/L EDTA溶液 0.5ml+ 49 ml H₂O混匀。

辅助气Gas2：50psi

碰撞气CAD：High

多反应监测离子通道如表2

2. 仪器设备



图1. ExionLC™ 2.0系统和SCIEX LC-MS/MS系统

3. 液相条件

液相：SCIEX ExionLC™ 2.0系统

色谱柱：Phenomenex EVO-C18(2.1 × 50mm, 1.7 μm)

流动相A相：H₂O(含 10 mmol/L DIPEA +50 mmol/L HFIP)

B相：ACN (含10 mmol/L DIPEA +50 mmol/L HFIP)

注：DIPEA：N-乙基二异丙胺；HFIP：六氟异丙醇

流速：0.3 mL/min

柱温：40 °C

梯度洗脱，洗脱程序如表1：

4. 质谱条件

SCIEX Triple Quad™ 6500+系统

数据采集方法：MRM（多反应监测）

离子源：ESI源

离子源参数：

气帘气CUR：35psi

IS电压：-4500V

源温度TEM：450°C

雾化气Gas1：50psi

表1. 液相梯度条件

时间 (min)	A%	B%
0	95	5
0.5	95	5
2.5	75	25
3.5	5	95
5.0	5	95
5.1	95	5
7.0	95	5

表2. MRM离子对信息

化合物	母离子 Q1(m/z)	子离子 Q3 (m/z)	DP(V)	CE(V)
Oligo 1	697.7	335.1	-90	-35
oligo 2	697.7	358.1	-90	-40

实验结果

灵敏度和线性考察

本实验采用Phenomenex Clarity® OTX 25mg 96孔固相萃取板对血浆样本进行前处理，配合7分钟的液相梯度方法对样本进行检测。

空白血浆、0.5 ng/mL和500 ng/mL 基质加标样品典型谱图见图2。从图2可以看出，空白基质血浆中无干扰，方法专属性好，特异性高。血浆中LLOQ 可低至0.5ng/mL，仪器灵敏度高。色谱峰峰形良好，可作为核酸药物定量研究提供液相条件参考。

使用空白血浆加入标准溶液，最终配置成0.5, 1, 2, 5, 10, 20, 100, 500ng/mL不同血浆浓度的标准曲线，前处理后，进LC-MS/MS系统进行分析。不同浓度的峰面积及线性回归方程见图3。从图3可见，0.5 ~500 ng/mL的浓度范围内，线性相关系数0.998，表明该方法线性关系良好。

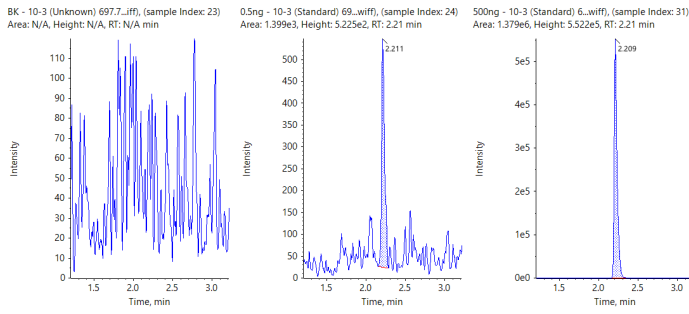


图2. 典型色谱图（从左到右，分别为空白血浆、0.5 ng/mL和500 ng/mL基质加标样品）

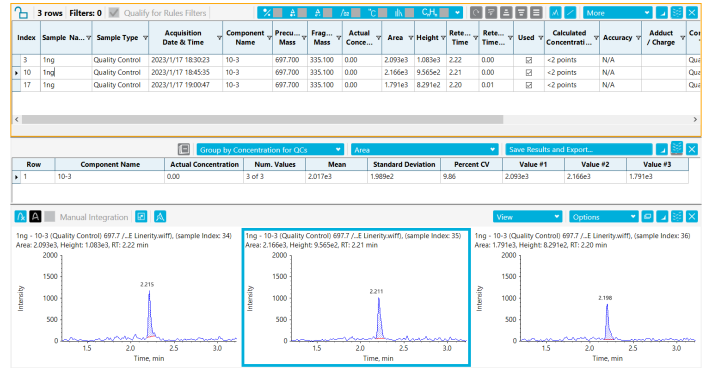


图4. 1ng/ml浓度连续进样3针色谱图，峰面积、保留时间列表

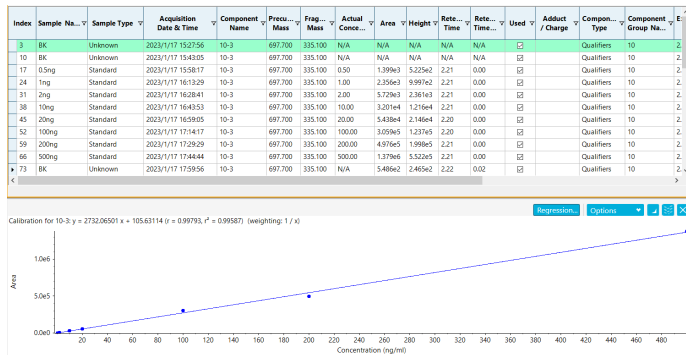


图3. 标准曲线和线性回归方程，线性相关系数 0.998

重现性

为考察低浓度的重现性，分别将平行处理的3个样品（浓度为1 ng/mL）进行重复性考察。3针样品（图5）连续采集，精密度（RSD）为9.86%，远满足生物样本重复性要求。

基质效应考察

取6份大鼠空白血浆提取液，分别加入标准溶液配制成低、中、高三浓度，每个浓度平行配制2个，该样本为后加标样本。同时，使用TE buffer溶液分别加入标准溶液配置成低、中、高三浓度，每个浓度配制1个，作为溶剂配制样本。

使用后加标样本和溶剂配制样本的峰面积，考察基质效应。基质效应结果（表3）可知，低、中、高不同浓度的基质效应在74~85%之间，6份基质效应结果RSD为5.58%，表明不同浓度的基质效应结果基本一致，且满足生物样本方法学要求。

表3. 3种不同浓度基质效应

加标量 (ng/mL)	溶剂中峰面积	后加标样品峰面积	基质效应 (%)
2	9.578e3	7.907e3	82.6
		8.160e3	85.2
20	1.050e5	8.841e4	84.2
		8.021e4	76.4
200	1.106e6	8.686e5	78.5
		8.214e5	74.2

提取回收率考察

取6份大鼠空白血浆提取液，分别加入标准溶液配制成2, 20, 200 ng/ml低、中、高三浓度，每个浓度平行配制2个，该样本为后加标样本。同时，取大鼠空白血浆加入标准溶液配置成血浆浓度为2, 20, 200 ng/ml三个浓度，每个浓度平行配制3个，作为前加标样品。

使用前加标样本和后加标样本的峰面积进行对比，以考察提取回收率。提取回收率结果（表4）可知，低、中、高浓度的提取回收率在52~58%之间，9份提取回收率结果RSD为2.56%，表明不同浓度的提取回收率结果基本一致，且满足生物样本方法学要求。

表4. 3种不同浓度回收率

加标量 (ng/mL)	后加标样品 峰面积 (均值)	前加标样品 峰面积	提取回收率 (%)
2	8.03e3	4.40e03	54.8
		4.32e03	53.8
		4.65e03	57.9
20	8.43e4	4.57e04	54.2
		4.46e04	52.9
		4.69e04	55.6
200	8.45e5	4.63e05	54.7
		4.70e05	55.6
		4.67e05	55.3

结论

本方法采用Phenomenex Clarity® OTX 25mg 96孔固相萃取板对血浆样品进行前处理，通过SCIEX Triple Quad™ 6500+ 系统对大鼠血浆中的核酸药物进行定量。该方法中空白血浆无干扰，专属性好，特异性高；血浆中LLOQ低至0.5 ng/ml，灵敏度高；低浓度下重现性和稳定性好；线性范围为0.5 -500 ng/ml，线性范围宽，线性关系良好；7分钟梯度方法，检测通量高。前处理方法基质效应小，提取流程简单已操作。该方案中包含核酸类药物的液质条件和血浆样本的方法前处理方法，为核酸类药物在生物样本中的定量研究工作提供LC-MS/MS方法和前处理提取方法的参考。

SCIEX临床诊断产品线仅用于体外诊断。仅凭处方销售。这些产品并非在所有国家地区都提供销售。获取有关具体可用信息，请联系当地销售代表或查阅<https://sciex.com.cn/diagnostics>。所有其他产品仅用于研究。不用于临床诊断。本文提及的商标和/或注册商标，也包括相关的标识、标志的所有权，归属于AB Sciex Pte. Ltd. 或在美国和/或某些其他国家地区的各权利所有人。

© 2023 DH Tech. Dev. Pte. Ltd. RUO-MKT-02-15688-ZH-A



SCIEX中国

北京分公司
北京市朝阳区酒仙桥中路24号院
1号楼5层
电话: 010-5808-1388
传真: 010-5808-1390
全国咨询电话: 800-820-3488, 400-821-3897

上海公司及中国区应用支持中心
上海市长宁区福泉北路518号
1座502室
电话: 021-2419-7201
传真: 021-2419-7333
官网: sciex.com.cn

广州办公室
广州国际生物岛星岛环北路1号
B2栋501、502单元
电话: 020-8842-4017

官方微信: [SCIEX-China](https://www.sciex.com.cn)