

SCIEX Triple Quad™ 系统定量分析大鼠血浆中的寡核苷酸药物 Inotersen

Quantification of Inotersen in rat plasma using the SCIEX Triple Quad™ System

冷向阳, 钟晨春, 龙志敏, 郭立海

Xiangyang Leng, Chenchun Zhong, Zhimin Long, Lihai Guo

SCIEX应用支持中心, 中国

Keywords: SCIEX Triple Quad™ System; Inotersen; Quantitative analysis; plasma; MRM; Oligo nucleotides.

引言

寡核苷酸药物作为热点药物之一, 近些年来备受瞩目。寡核苷酸药物是由人工化学合成的寡核苷酸单链或双链组成的一类药物, 根据其结构和作用机理的不同, 主要分为反义核酸 (ASO)、小干扰RNA (siRNA)、微小RNA (miRNA)、小激活RNA (saRNA)、核酸适配体 (aptamer)、核酶 (ribozyme) 等。其中ASO和siRNA类型的寡核苷酸药物应用广泛, 目前已逐渐应用于抗肿瘤、病毒治疗、免疫调节等诸多方面^[1]。

ASO是一种单链寡核苷酸分子, 进入细胞后与序列互补与靶标mRNA结合, 在核糖核酸酶H1 (RNase H1) 的作用下, 引起mRNA的降解, 从而抑制蛋白的表达。Inotersen (商品名为Tegsedi) 是一种ASO药物, 于2018年批准上市, 主要用于遗传性转甲状腺素蛋白淀粉样变性 (hATTR) 成人患者, 治疗其第1阶段或第2阶段多发性神经病变。它通过与编码TTR蛋白的mRNA相结合, 能够导致mRNA的降解, 从而降低TTR蛋白 (野生型和突变型) 的水平。

本文建立了使用SCIEX Triple Quad™ 系统对大鼠血浆中的Inotersen定量分析的方法, 使用固相萃取的前处理方式, 方法专属性强、灵敏度高, 可以很好的满足Inotersen在生物基质样本中的定量检测需求。

本实验方法特点:

1. 使用三重四极杆质谱 (SCIEX Triple Quad™ 系统) 测定 Inotersen, 定量下限LLOQ为0.2 ng/ml, 灵敏度高, 同时能实现较宽的线性范围和良好的重现性。
2. 前处理采用Clarity OTX™ 萃取试剂盒进行固相萃取, 能够有效的实现对血浆样品的净化, 前处理方法简单、方便。

仪器设备

Exion LC™ AD 系统 + SCIEX Triple Quad™ 系统



实验方法

1. 样品信息和试剂

Inotersen标准品 (分子式: $C_{230}H_{318}N_{69}O_{121}P_{19}S_{19}$, 分子量: 7178.05); Clarity OTX™ 萃取试剂盒购于Phenomenex, 包含96孔板、裂解缓冲液、平衡缓冲液、淋洗缓冲液和洗脱缓冲液。

2. 样品制备

Inotersen标准品使用pH 8.0的10 mM Tris-HCl 溶液（含1mM EDTA）进行溶解和稀释。

取100 μ L大鼠血浆样本，其中加入标准品配置成0.2 ~ 500 ng/mL 系列样品，作为标准曲线。血浆样品SPE处理流程如表1。

表1. 大鼠肝组织SPE处理流程

步骤	溶剂
样品预处理	血浆100 μ L+100 μ L裂解液+200 μ L 50mM醋酸铵
活化	1mL \times 2; 100%甲醇
平衡	1mL \times 2; 平衡液或用50mM醋酸铵, pH 5.5
上样	400 μ L; 3-5秒一滴
淋洗	1mL \times 3; 淋洗液或用50mM醋酸铵pH5.5, 50%乙腈
洗脱	500 μ L \times 2; 100mM pH9.5 碳酸氢铵: 乙腈 (1:1)
吹干	N ² , 30 $^{\circ}$ C
复溶	100 μ L, pH 8.0的10 mM Tris-HCl 溶液 (含1mM EDTA)

3. 液相方法

色谱柱: : Kinetex EVO C18 2.6 μ m, 100 \times 2.1 mm

流动相: A相: 水 (含100 mM 六氟异丙醇, 10 mM N,N-二异丙基乙胺)

B相: 乙腈 (含100 mM 六氟异丙醇, 10 mM N,N-二异丙基乙胺)

流速: 0.4 mL/min

柱温: 40 $^{\circ}$ C;

流动相梯度:

Time(min)	A (%)	B (%)
0.00	90	10
1.00	90	10
3.00	60	40
4.00	10	90
4.50	10	90
4.60	90	10
7.00	90	10

4. 质谱方法

离子源: ESI源, 负离子模式

离子源参数:

电喷雾电压IS: -4500 V

气帘气 CUR: 35 psi

雾化气 GS1: 60 psi

辅助加热气GS2: 50 psi

碰撞气 CAD: 12

源温度 TEM: 400 $^{\circ}$ C

表2. Inotersen的质谱参数

化合物名称	Q1 Mass	Q3 Mass	DP	CE	EP	CXP
Inotersen	717.2	94.8	-60	-146	-10	-15

实验结果

- 灵敏度和重复性:** 本实验中采用Clarity OTX™ 萃取试剂盒对大鼠血浆样品进行处理, 能够有效的实现对样品的净化, 方法定量下限 (LOQ) 为0.2 ng/mL, 空白中无干扰, 方法选择性好, 灵敏度; 定量下限样品连续重复进样6针, RSD%<3.5%, 重复性良好。

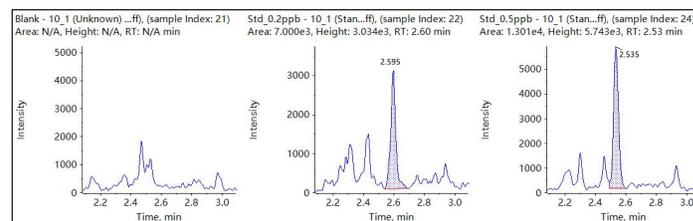


图1. 在空白血浆样品、0.2 ng/ml和0.5 ng/ml 典型色谱图

- 线性范围:** 在大鼠血浆中Inotersen在线性范围0.2-500ng/ml内线性关系良好, 相关系数大于0.998, 标曲各点准确度在91.9%-109.1%之间。
- 提取回收率和基质效应结果:** 采用固相萃取法对大鼠血浆进行处理, 考察Inotersen在低、高浓度下的提取回收率和基质效应。结果见表3。Inotersen 在1 ng/ml 和50 ng/ml 浓度下的提取回收率分别为71.21%和77.20%, 基质效应分别为83.52% 和70.88%。

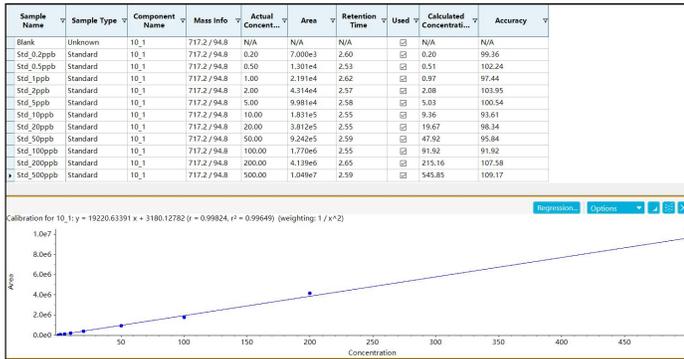


图2. 大鼠血浆中Inotersen标准曲线图

表3. 大鼠血浆中不同浓度下的提取回收率和基质效应

样品浓度 (ng/ml)	提取后样品峰面积	未经提取样品峰面积	同浓度标准溶液峰面积	提取回收率	基质效应
1	21910	30770	36841	71.21%	83.52%
50	924237	1197187	1688956	77.20%	70.88%

总结

本文使用固相萃取方式对大鼠血浆进行前处理，利用SCIEX Triple Quad™ 系统对大鼠血浆中Inotersen进行定量分析。本方法定量下限为0.2 ng/ml，在线性范围0.2-500 ng/ml内线性关系良好，在不同浓度下的提取回收率大于71%，基质效应大于70%，可以满足目标Inotersen的检测需求。同时也为其他寡核苷酸药物的检测分析提供方法参考。

参考文献

- [1] 李娜, 方珍文, 王啸林等. 寡核苷酸药物定量分析方法的研究进展[J]. 药物分析杂质, 2011, 31(5): 992-996

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。

© 2024 DH Tech. Dev. Pte. Ltd. RUO-MKT-02-32971-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)