

LC-MS/MS 测定血浆中反义寡核苷酸药物诺西那生的含量

LCMSMS-953

摘要： 本文采用岛津超高效生物惰性液相色谱仪与三重四极杆质谱联用建立了血浆中反义寡核苷酸诺西那生的定量分析方法。方法学验证结果表明：灵敏度良好，2 ng/mL 基质标准溶液信噪比为 12.82；在 2~500 ng/mL 浓度范围内基质标线性良好，线性相关系数为 0.9989，准确度为 92.45%~106.72%；精密度实验中，10 ng/mL 标准溶液重复分析 6 次，保留时间 RSD 为 0.165%，峰面积比 RSD 为 2.81%，重复性良好；实际样品加标回收实验中，10、50、400 ng/mL 加标回收率分别为 91%、110.7%、106.36%，加标回收率良好。该方法灵敏度高、线性、重复性和加标回收率良好，可用于生物样本中诺西那生定量分析。

关键词： 诺西那生 LC-MS/MS 反义寡核苷酸

技术特点：

- ❖ 采用惰性液相和惰性色谱柱，降低寡核苷酸吸附和残留。
- ❖ 采用 RX 离子聚焦功能，保证 +4 mm 喷针处不降低灵敏度，提升生物样本质谱检测抗污染能力。

反义寡核苷酸 (Antisense oligonucleotides, ASOs) 是一种治疗性核酸分子，通常由 15 到 20 个核苷酸单元组成。其原理主要通过人工合成的短链核酸序列，设计成与特定信使 RNA (mRNA) 序列互补，通过精确匹配目标 mRNA 上的序列，能够特异性地识别并结合到这些 mRNA 上，从而影响 mRNA 的功能和后续的蛋白质合成过程，达到抑制目标基因的表达，从而进行相关疾病的治疗。

诺西那生 (Nusinersen) 是一种反义寡核苷酸

(ASO) 药物，专门设计用于治疗脊髓性肌萎缩症 (Spinal Muscular Atrophy, SMA)。诺西那生需要通过鞘内注射给药，即直接注入脊髓周围的脑脊液中，以确保药物能够直接作用于目标神经元。它是首个且是目前治疗 SMA 的重要药物之一。

质谱法由于其专属性强、灵敏度高、检测范围宽，在寡核苷酸生物样本检测中具有非常大的应用潜力。本文采用 LC-MS/MS 建立了血浆样品中寡核苷酸的定量分析方法，为相关分析人员提供参考。

实验部分

1.1 仪器

本实验采用岛津超高效生物惰性液相色谱仪 LC-40D XSi 与三重四极杆质谱仪 LCMS-8045RX 联用系统。

液相具体配置为：

系统控制器：	CBM-40A	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	色谱工作站：	LabSolutions Ver. 5.118

1.2 分析条件

液相色谱条件

色谱柱：	Shim-pack Scepter Claris C4-300 (50 mm x 2.1 mm I.D., 1.9 μm, P/N: 227-31208-01, 岛津 (上海) 实验器材有限公司)		
流动相：	A 相 -10mM DIPEA+25mM HFIP 水溶液, B 相 -A 相: 乙腈 =1: 1 (v/v)		
流速：	0.3 mL/min	柱温：	55°C
进样体积：	10 μL		

洗脱方式：梯度洗脱，B相初始浓度为10%，时间程序见表1。

表1 流动相梯度洗脱程序

Time(min)	Module	Command	Value
1.00	Pumps	Pump B Conc.	10
5.00	Pumps	Pump B Conc.	50
6.00	Pumps	Pump B Conc.	100
8.00	Pumps	Pump B Conc.	100
8.10	Pumps	Pump B Conc.	10
10.00	Controller	Stop	

质谱条件

离子源：ESI (-)	CID 气：230 kPa
喷针位置：+4 mm	接口温度：300°C
接口电压：-3 kV	DL 温度：250°C
聚焦电压：-1 kV	加热块温度：500°C
雾化气：氮气 4 L/min	扫描模式：MRM
加热气：空气 20 L/min	MRM 参数：见表2
干燥气：氮气 3 L/min	

表2 MRM 参数

No.	中文名	英文名	CAS. No.	离子对	Q1 Pre (V)	CE	Q3 Pre (V)
1	诺西那生	Nusinersen	1258984-36-9	890.00>393.00*	24.0	44.0	25.0
				1017.00>393.00	50.0	54.0	25.0
2	内标	/	/	855.60>176.80	24.0	55.0	28.0

注：1. *表示定量离子；2. 内标为DNA，分子量为6854.53 Da

1.3 标准品配制

标准储备液：准确称取标准品1 mg，用超纯水溶解并定容至1 mL，配制浓度为1000 µg/mL 标准储备液。

标准溶液：取适量标准储备液，用超纯水逐级稀释成0.2、0.5、2、10、20、50 µg/mL 工作液，取10 µL 工作液加入485 µL 空白血浆，再加入5 µL 内标溶液（10 µg/mL），混匀后，并按1.4 样品前处理方式进行基质校准曲线点的制备。

1.4 样品前处理

样品预处理

· 移取485 µL 血浆，加入5 µL 内标工作液，加入10 µL 水至1.5 mL 离心管中，加入500 µL 裂解液，涡旋混合均匀。



净化

- 活化：依次使用甲醇、pH=5.5 的乙酸铵水溶液活化 96 孔固相萃取板。
- 淋洗：使用 pH=5.5 的乙酸铵溶液溶液淋洗固相萃取板。
- 洗脱：使用 500 μ L pH=9.5 碳酸氢铵溶液洗脱固相萃取板 2 次，收集洗脱液。



定容

- 氮吹：对洗脱液进行氮吹，使其中有机溶剂挥发。
- 定容：使用超纯水定容至 1 mL。

■ 结果与讨论

2.1 RX 离子源参数优化

为考察最优的 RX 离子源参数，优化了喷针位置及聚焦电压对响应的影响，通过下图 1 发现，喷针位置在 +4 mm 和 +5 mm 处响应最优，通过喷针位置水平的调整，在满足灵敏度前提下，提升质谱对基质的耐污染水平；离子聚焦水平取决于聚焦电压、喷针位置及化合物性质，诺西那生在 -1 kV 的聚焦电压下，有最优的响应。

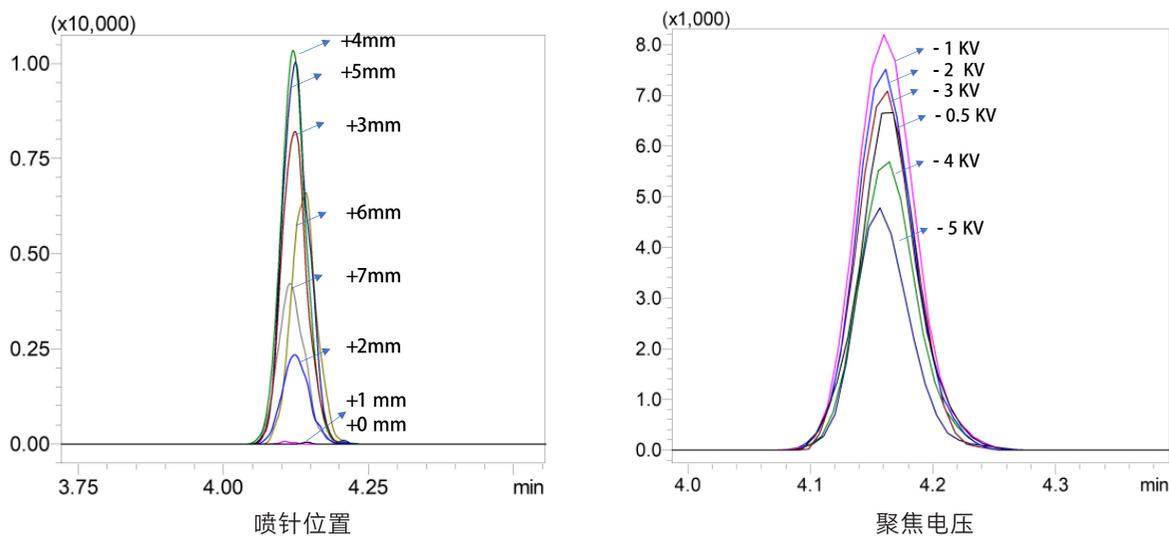


图 1 RX 离子源喷针位置及聚焦电压优化

2.2 色谱柱选择及优化

寡核苷酸药物由于其具有多个磷酸基团，与不锈钢金属材料接触可能发生非特异性吸附而导致残留及峰形异常，本文考察了惰性液相结合惰性填料和涂层的色谱柱，和常规 C18 填料的色谱柱进行分析，如下图所示，常规色谱柱易发生非特异性吸附导致峰形异常、拖尾，而惰性填料的色谱柱，峰形对称正常，尖锐。

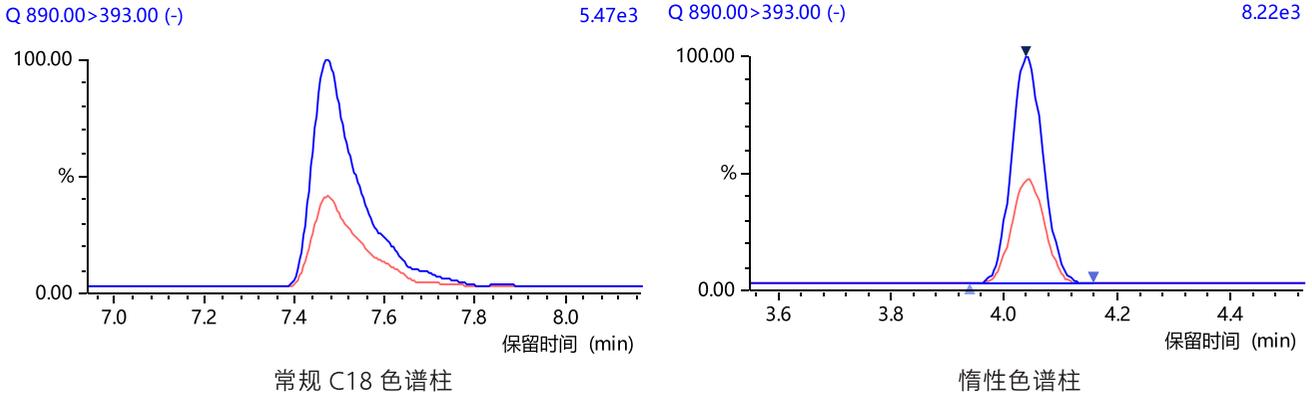


图 2 惰性和非惰性色谱柱差异比较

2.3 标准溶液色谱图

血浆基质中诺西那生定量下限 (LLOQ) 为 2 ng/mL, 信噪比为 12.82, 诺西那生和内标的色谱图如图 3 所示。

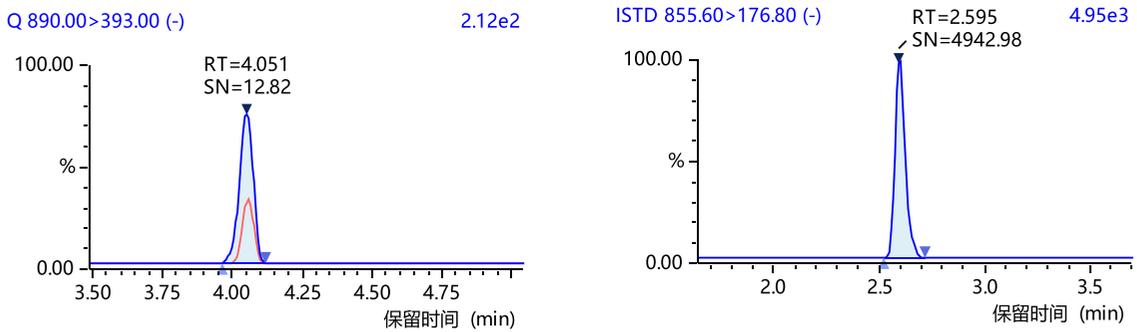


图 3 诺西那生 (2 ng/mL, 左) 及内标 (50 ng/mL, 右) MRM 图

2.4 系统残留考察

本文采用惰性液相结合惰性填料色谱柱进行了诺西那生分析, 进行系统残留考察, 分析完校准曲线最高点 500 ng/mL 标准溶液后, 分析空白溶液, 空白处无色谱峰检出, 系统无残留, 具体如图 4 所示。

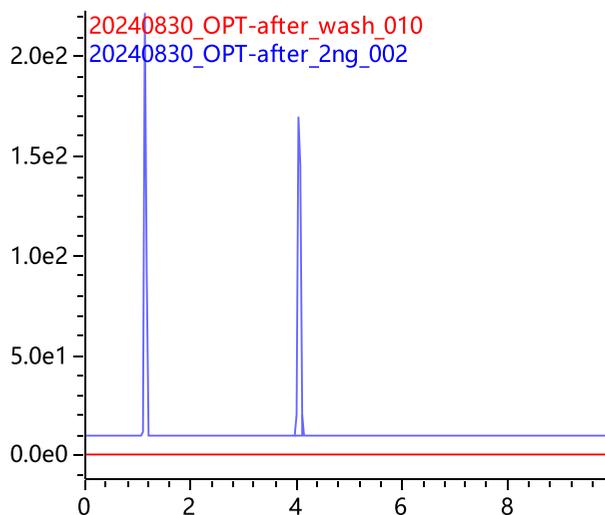


图 4 分析空白溶液 MRM 图

2.5 校准曲线

按 1.2 中的分析条件分析基质标准溶液，浓度为 2、5、20、100、200、500 ng/mL。以目标物与内标的浓度比为横坐标，峰面积比为纵坐标，采用内标法建立校准曲线，如图 5 所示。在 2~500 ng/mL 线性浓度范围内，线性相关系数为 0.9989，线性良好，标准溶液回读准确度为 92.45%~106.72%，准确度高。

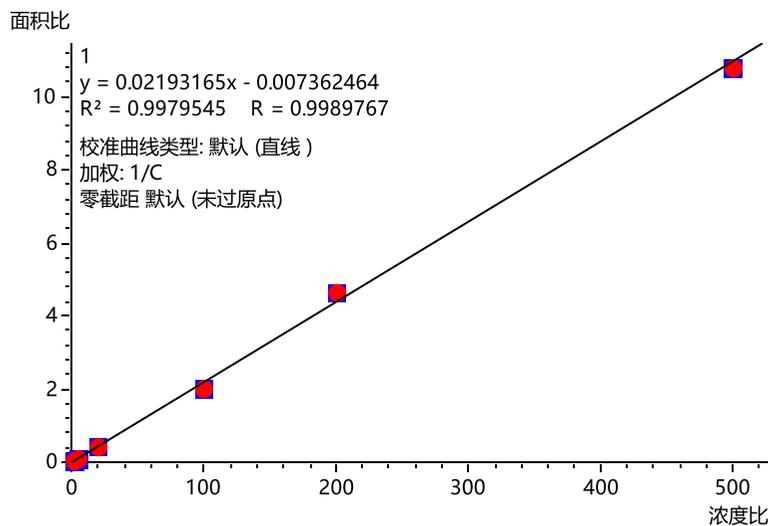


图 5 校准曲线

2.6 精密度实验

按照 1.2 分析条件，将浓度为 10 ng/mL 的基质标准溶液重复分析 6 次，重复性谱图如图 6 所示。诺西那生保留时间 RSD 为 0.165%，峰面积比 RSD 为 2.81%，重复性结果良好。

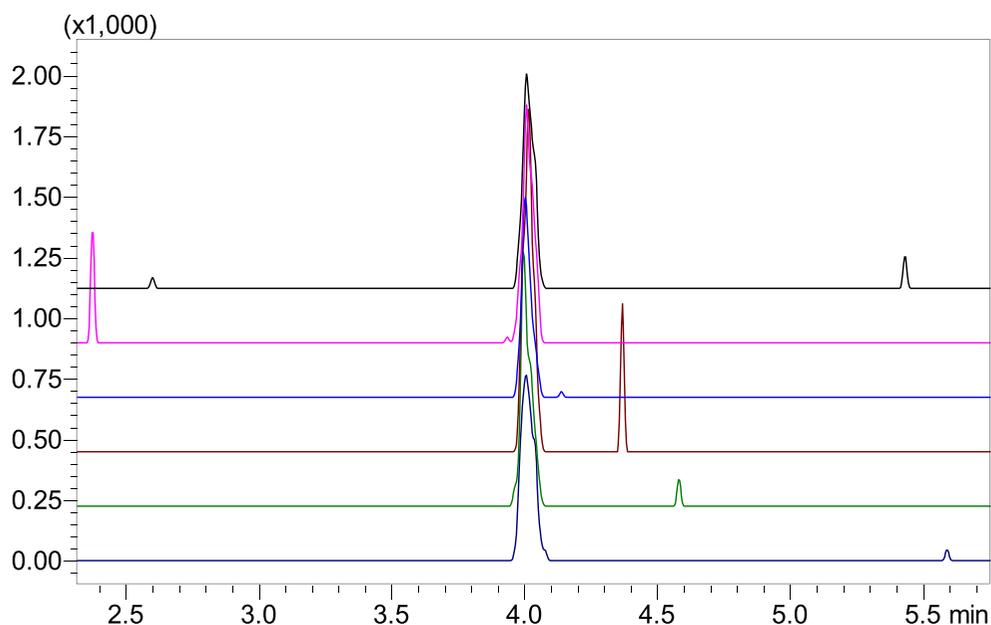


图 6 10 ng/mL 基质标准溶液重复分析 MRM 图 (n=6)

2.7 样品测定及加标实验结果

按照 1.4 中样品处理方法对血浆样品进行处理，上机分析，样品中未检出诺西那生。对此样品进行加标实验，加标量为 10、50、400 ng/mL。重复实验 3 次，加标结果如表 3 所示，此方法回收率及重复性良好。

表 3 血浆样品中诺西那生定量及加标结果

No.	化合物名	样品浓度 (ng/mL)	加标量 (10 ng/mL)		加标量 (50 ng/mL)		加标量 (400 ng/mL)	
			回收率 (%)	RSD (%)	回收率 (%)	RSD (%)	回收率 (%)	RSD (%)
1	诺西那生	N.D.	91.0	8.16	110.7	4.92	106.36	3.37

备注：N.D. 表示未检出

■ 结论

本文采用岛津超高效生物惰性液相系统与三重四极杆质谱仪联用建立了血浆中寡核苷酸药物诺西那生的分析方法。该方法灵敏度高、耐用性好，无残留，加标回收率稳定可靠，可用于实际生物样本基质中寡核苷酸药物诺西那生的定量分析。

岛津应用云

