LC-MS/MS 测定血浆中反义寡核苷酸含量

LCMSMS-929

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福米韦生的定量分析方法。通过优化质谱参数，1 ng/mL 基质标准溶液信噪比为 17。在 1~200 ng/mL 浓度范围内基质校准曲线线性良好，线性相关系数为 0.9998，准确度为 92.7%~104.8%。精密度实验中，2 ng/mL 标准溶液重复分析 6 次，保留时间 RSD 为 0.15%，与内标的峰面积比 RSD 为 3.18%，重复性佳。实际样品加标实验中，20、100、400 ng/mL 加标回收率分别为 83.2%、90.6%、92.4%，回收率高。实验结果表明，该方法灵敏度高、重复性佳、回收率高，可用于反义寡核苷酸药代动力学（DMPK）分析。

关键词：反义寡核苷酸　LC-MS/MS　福米韦生　DMPK

技术特点：

❖ 此方法灵敏度高，定量下限 LLOQ 为 1 ng/mL。
❖ 采用生物惰性液相分析系统，抑制了寡核苷酸和金属表面的非特异性吸附，保证样品在色谱系统无残留。

寡核苷酸药物是长度较短、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。寡核苷酸药物主要有反义寡核苷酸（ASO）、小干扰 RNA（siRNA）、微小 RNA（miRNA）、RNA 适配体（RNA aptamer）等。

在寡核苷酸药物研发或临床阶段，生物基质样品中寡核苷酸的定量分析对药代动力学分析是至关重要的，分析结果可对这类药物的结构改造及递送系统的优化起到指导作用，达到改善药物的稳定性和提高递送效率的目的。

目前，可用于生物样品中寡核苷酸药物分析的方法主要有荧光法、qPCR 法、ELISA、质谱法等，其中质谱法具有较好的选择性和抗基质干扰能力，且可实现多组分同时分析，应用较广。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。

■ 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-8060NX 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 C18-300 (100 mm x 2.1 mm I.D., 1.9 μm，P/N：227-31209-02，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℃
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
5.00	Pumps	Pump B Conc.	50
5.10	Pumps	Pump B Conc.	100
6.10	Pumps	Pump B Conc.	100
6.10	Pumps	Pump B Conc.	10
10.00	Controller	Stop	

质谱条件

离子源：ESI（-）
毛细管位置：+4
接口电压：-3 kV
聚焦电压：-0.5 kV
雾化气：氮气 3 L/min
加热气：空气 15 L/min
干燥气：氮气 3 L/min
CID 气：300 kPa
接口温度：350℃
DL 温度：250℃
加热块温度：400℃
Q1/Q3 分辨率：Low
扫描模式：MRM
MRM 参数：见表 2

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	福米韦生	Fomivirsen	144245-52-3	834.00>319.05*	22.0	38.0	24.0
				953.30>319.10	24.0	40.0	16.0
2	内标	/	/	855.70>176.60*	30.0	49.0	20.0
				978.20>176.50	22.0	49.0	13.0

注：1. * 表示定量离子；2. 内标为 DNA，分子量为 6854.8 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，用空白基质溶液逐级稀释，并添加内标溶液，配制浓度为：1、2、5、10、20、50、100、200 ng/mL 的基质标准溶液，内标浓度为 50 ng/mL。

1.4 样品前处理

样品预处理

· 移取 500 μL 血浆至 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。
· 上样：将待净化的预处理液加入固相萃取板
· 淋洗：使用 pH=5.5 的乙酸铵水溶液和乙酸铵乙腈溶液淋洗固相萃取板。
· 洗脱：使用 500 μL 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：在样品溶液中加入内标，并使用超纯水定容至 1 mL。

■ 结果与讨论

2.1 标准溶液色谱图

通过全方位的质谱参数优化，血浆中福米韦生定量方法的定量下限（LLOQ）1 ng/mL，信噪比为 17.7，具体福米韦生和内标的色谱图如图 1 所示。

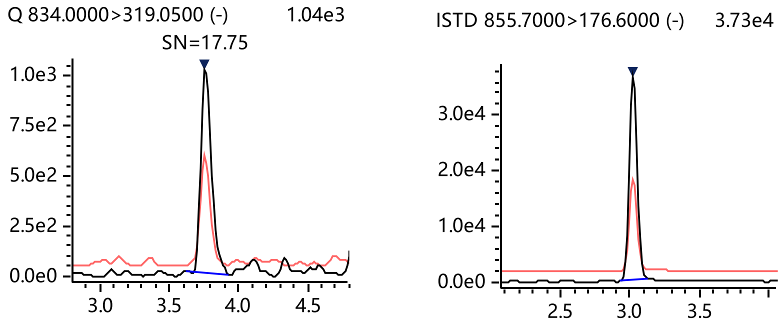

图 1　福米韦生（1 ng/mL，左）及内标（50 ng/mL，右）MRM 图

2.2 系统残留考察

福米韦生是一种反义寡核苷酸，其结构中含多个磷酸基团，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。所以，本文进行了系统残留考察，分析完校准曲线最高点 200 ng/mL 标准溶液后，分析空白溶液，如采用常规液相系统，空白溶液中检出微量福米韦生福米韦生，如采用惰性液相系统，则无残留，具体如图 2 所示。

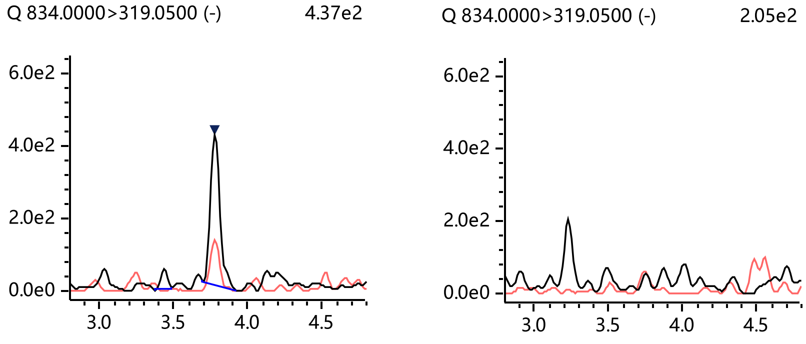

图 2　常规液相（左）和惰性液相（右）分析空白溶液 MRM 图

2.3 校准曲线

按 1.2 中的分析条件分析系列基质标准溶液，浓度为 1、2、5、10、20、50、100、200 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 3 所示。在 1~200 ng/mL 线性浓度范围内，线性相关系数为 0.9998，线性良好，标准溶液回读准确度为 92.7%~104.8%，准确度高。

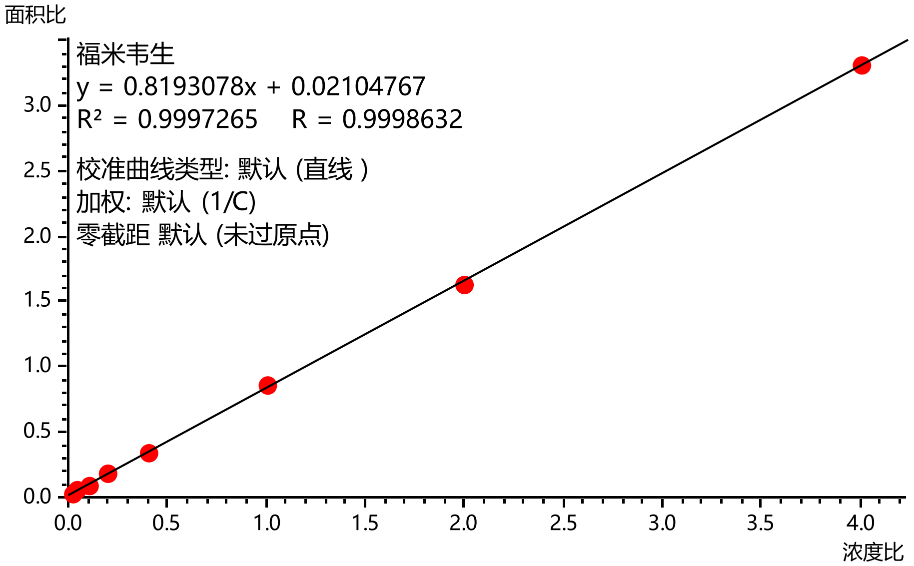

图 3 校准曲线

2.4 精密度实验

按照 1.2 分析条件，将浓度为 2 ng/mL 的基质标准溶液重复分析 6 次，重复性谱图如图 4 所示。福米韦生保留时间 RSD 为 0.15%，峰面积比 RSD 为 3.88%，重复性结果良好。

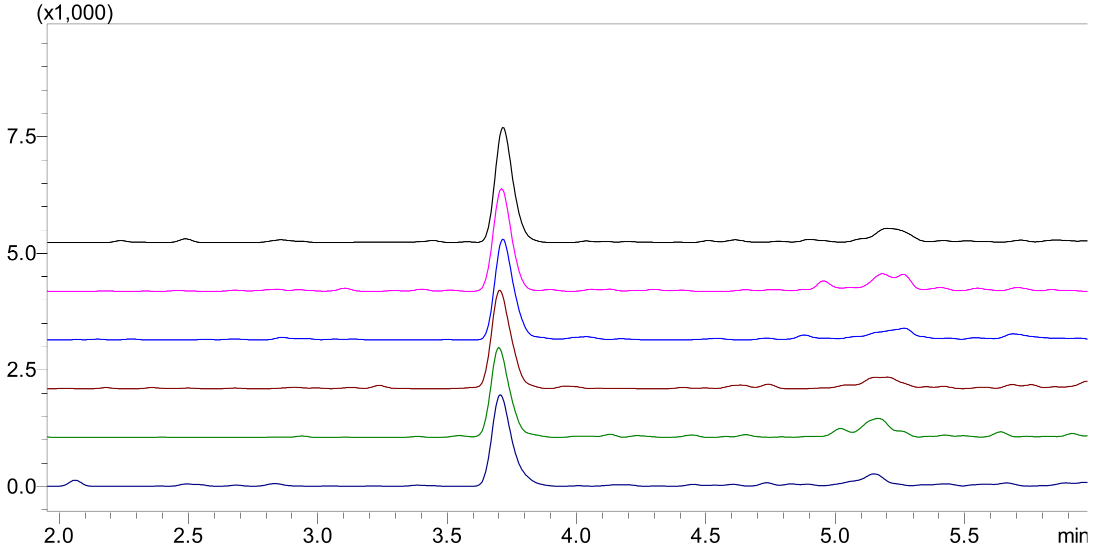

图 4 2 ng/mL 基质标准溶液重复分析 MRM 图（n=6）

2.5 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，样品中未检出福米韦生。对此样品进行加标实验，加标量为 20、100、400 ng/mL，加标后色谱图如图 5 所示。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佳。

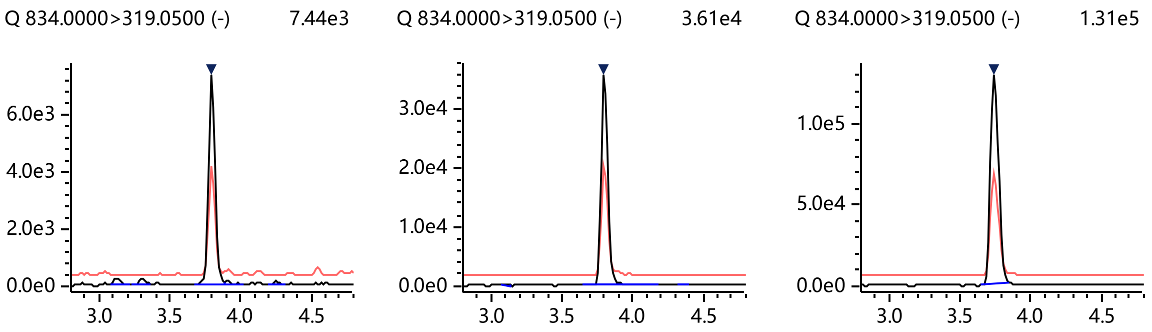

图 5　样品加标后 MRM 图（从左至右加标浓度分别为：20、100、400 ng/mL）

表 3　血浆样品中福米韦生定量及加标结果

No.	化合物名	样品浓度（ng/mL）	加标量（20 ng/mL）		加标量（100 ng/mL）		加标量（400 ng/mL）	
			回收率 (%)	RSD(%)	回收率 (%)	RSD(%)	回收率 (%)	RSD(%)
1	福米韦生	N.D.	83.2	7.72	90.6	5.33	92.4	6.46

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的分析方法。此方法灵敏度高且无残留，线性范围广，实际样品加标检测回收率高，可用于生物基质样本中寡核苷酸药物的定量分析。