

应用X500B QTOF系统建立大鼠血浆中siRNA的定量分析方法

Quantification of siRNA in rat plasma using the X500B QTOF System

刘响, 罗继, 郭立海

Liu Xiang, Luo Ji, Guo Lihai

SCIEX应用技术中心, 中国

SCIEX, China

关键词: X500B QTOF System, siRNA, Quantitative analysis

前言

寡核苷酸是药物发展的新领域, 这类药物是人工合成的DNA或RNA片段, 一般由15 ~ 50个核苷酸组成。其中, 应用最广泛、开发前景最好的主要有两类: 反义寡核苷酸 (antisense oligonucleotide, AS-OGN) 和小干扰RNA (small interfering RNA, siRNA)。AS-OGN是DNA或RNA单链片段, 其核苷酸序列可与靶mRNA或靶DNA杂交, 抑制或封闭该基因的转录和表达, 或诱导RNaseH识别并切割mRNA使其丧失功能, 从而发挥治疗作用。siRNA是一种双链RNA, 通过RNA干扰通路影响基因表达^[1]。

在临床前及临床研究阶段, 定量分析生物样品中的寡核苷酸, 以及鉴定代谢产物在其药代动力学 (PK)、药动学/药效学 (PK/PD) 和毒代动力学 (TK) 评价中是至关重要的。高分辨率质谱 (HRMS) 全扫描在寡核苷酸定量分析的应用中引起了人们极大的兴趣。这种方法不仅可以提供目标寡核苷酸的定量信息, 而且还提供杂质和代谢产物相关的信息^[2]。

本方法采用固相萃取的前处理方法, 通过X500B QTOF系统对大鼠血浆中的siRNA进行直接定量, 检测限 (LOD) 为1 ng/mL, 定量限 (LLOQ) 为5 ng/mL, 特点如下:

- 1、使用 X500B QTOF系统, 能够实现快速分析、操作简单, 同时获得高分辨率、高灵敏度的 LC-HRMS方法。
- 2、采用Clarity OTX™ 萃取试剂盒, 能够有效的实现对样品的净化, 前处理方法简单、典型萃取回收率大于80%。

- 3、方法检测灵敏度高 (LOD:1ng/mL; LLOQ:5 ng/mL), 较宽的线性范围 (5 ~10000 ng/mL) 以及良好的定量重现性 (RSD < 10%)。

实验方法

1. 样品和试剂

合成的siRNA标准品由客户提供 (序列保密), 长度为: 正义链19 mer, 反义链21 mer。为抵抗核酸酶的降解, 提高药物在体内的稳定性, 该siRNA序列包含硫代磷酸修饰、2'-烷氧基修饰和氟代寡核苷酸修饰 (如图1所示)。内标 (IS) 为合成的DNA长度21 mer, 由客户提供。

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。六氟异丙醇 (HFIP)、二异丙基乙胺 (DIPEA) 购于Sigma Aldrich。

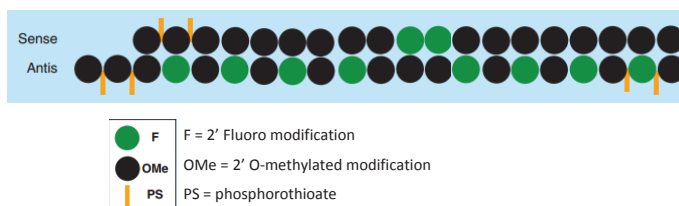


图1. siRNA 的核苷酸序列和修饰信息

2. 样品制备

2.1 样品准备

90 μ L大鼠血浆中分别加入5 μ L siRNA标准品溶液，终浓度为 5 ~10000 ng/mL，和5 μ L内标溶液 (DNA, 100 ng/mL)，涡旋混匀。加入 300 μ L裂解缓冲液，震荡混匀。

2.2 固相萃取 (Phenomenex Clarity OTX™ 96-well plate, 100 mg/well)

活化：1mL 甲醇

平衡：1mL平衡缓冲液

上样：400 μ L样品

淋洗：1mL 淋洗缓冲液 $\times$ 3次

洗脱：2 $\times$ 500 μ L 洗脱缓冲液

洗脱液经氮气吹干后，用100 μ L复溶液溶解后离心上样。

(复溶液：10mM DIPEA+25mM HFIP in H₂O:MeOH=9:1)

3. 液相条件

液相：ExionLC™ AD系统

色谱柱：Phenomenex Kinetex EVO C18
(100 $\times$ 2.1 mm, 1.7 μ m, 100 Å)

流动相：A：水 (含10mM DIPEA+25mM HFIP)
B：甲醇 (含10mM DIPEA+25mM HFIP)

流速：0.3 mL/min

柱温：60°C

进样体积：30 μ L

梯度洗脱，洗脱程序如表1：

表1. 液相梯度条件

时间 (min)	A%	B%
0	95	5
4	5	95
4.5	5	95
4.6	95	5
8	95	5

4. 质谱条件

X500B QTOF系统

数据采集方法：高分辨多反应监测 (MRMHR)

采集模式：负离子模式

离子源参数：

IS电压：-4500 V 气帘气 CUR: 45 psi

碰撞气 CAD: 7 雾化气 GS1: 55 psi

辅助气 GS2: 55 psi 源温度 TEM: 600°C

质谱采集参数如表2：

表2. 质谱采集参数

	Value
TOF MS scan	
扫描范围 Mass Scan (m/z)	600 - 1200
去簇电压 Delustering Potential (V)	-80
碰撞能量 Collision Energy (V)	-10
累积时间 Accumulation Time (ms)	300
MRMHR scan	
siRNA - Product Ion -10 Charge State	680.5
IS - Product Ion -8 Charge State	760.0
扫描范围Mass Range (m/z)	100 - 1500
去簇电压Delustering Potential (V)	-80
碰撞能量 Collision Energy (V)	-40 $\pm$ 5

实验结果

1. siRNA标准品定量结果

首先考察了siRNA标准品检测最低定量限 (LLOQ)、线性范围和重现性。通过X500B QTOF系统对siRNA纯品进行直接定量，检测限 (LOD) 为1 ng/mL，定量限 (LLOQ) 为5 ng/mL，siRNA标准品在5~10000 ng/mL的浓度范围内线性良好， $R^2 > 0.999$ (weighting: 1/x) (图2)。同时对最低定量限5 ng/mL连续重复进样6针，考察定量重现性和稳定性。如图3所示，连续进样6针重现性较好，排除最后一针有进样干扰，其他5针精密度 (RSD) 为8.44%，准确度为87-109%之间。

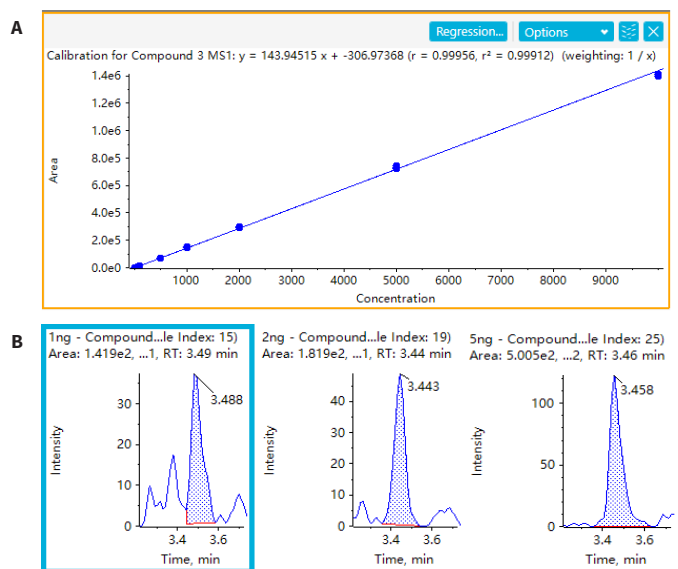


图2: A: siRNA的反义链 -10电荷一级离子m/z 680.48定量的线性方程和线性图谱, 线性范围5~10000 ng/mL, 线性相关系数 $r^2=0.99912$; B: siRNA在1ng/mL、2 ng/mL和5 ng/mL纯品中的提取离子流色谱图

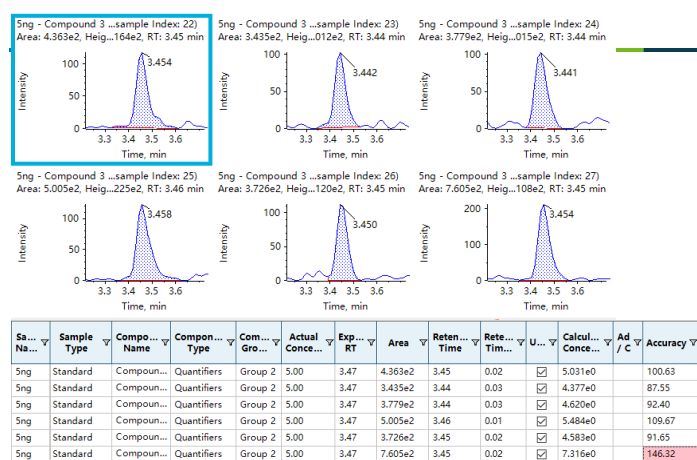


图3: A: siRNA的最低定量限5 ng/mL标准品溶液重复进样6针的提取离子流色谱图; B: siRNA的最低定量限5 ng/mL标准品溶液重复进样6针的精密度和准确度结果

2. 血浆中siRNA定量结果

本实验也开发和优化了siRNA在大鼠血浆中的提取方法, 采用 Clarity OTX™ 萃取试剂盒, 能够有效的实现对样品的净化, 前处理方法简单、典型萃取回收率大于80%。使用 X500B QTOF系统进行

定量分析, 大鼠血浆中siRNA检测限 (LOD) 为1 ng/mL, 定量限 (LLOQ) 为5 ng/mL, siRNA在5~10000 ng/mL的浓度范围内线性良好, $R^2 > 0.998$ (weighting: $1/x$) (图4)。同时对最低定量限5ng/mL连续重复进样6针, 考察大鼠血浆样品中siRNA定量重现性。如图5所示, 连续进样6针重现性较好, 精密度 (RSD) 为9.41%, 准确度为90-120%之间。

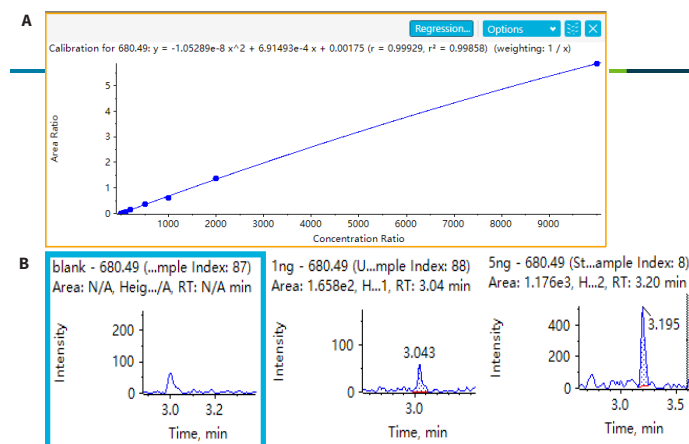


图4: A: 大鼠血浆中siRNA定量的线性方程和线性图谱, 线性范围5~10000 ng/mL, 线性相关系数 $r^2=0.99858$; B: 在空白血浆、2 ng/mL和5 ng/mL大鼠血浆中 siRNA的提取离子流色谱图

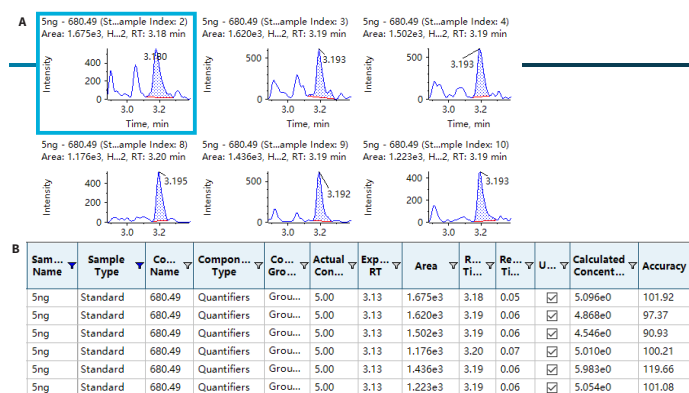


图5: A: 大鼠血浆中siRNA在最低定量限5ng/mL重复进样6针的提取离子流色谱图; B: 大鼠血浆中siRNA在最低定量限5ng/mL重复进样6针的精密度和准确度结果

3. 质控样品定量结果

为了考察方法的重现性及准确度，分别在大鼠血浆中制备3个批次低、中、高浓度的质量控制（QC）样品：20、40、400、4000 ng/mL，进行精密度和准确度方法验证。如表3所示，siRNA在3个批次的低、中、高浓度样品的精密度（RSD）均在10%以内，准确度均在90-103%以内。

表3. siRNA的质控样品（QC）的准确度和精密度

Actual Concentration	Num. Values	Mean	Standard Deviation	Percent CV	Accuracy	Value #1	Value #2	Value #3
20.00	3 of 3	2.044e1	9.803e-1	4.80	102.18	2.134e1	2.058e1	1.939e1
40.00	3 of 3	4.107e1	8.114e-1	1.98	102.67	4.031e1	4.097e1	4.192e1
400.00	3 of 3	3.782e2	2.648e1	7.00	94.55	3.499e2	3.822e2	4.024e2
4000.00	3 of 3	3.755e3	3.767e2	10.03	93.89	3.340e3	4.075e3	3.851e3

4. 前处理回收率结果

本实验采用Clarity OTX™ 萃取试剂盒进行大鼠血浆中siRNA的提取，同时考察了在低、中、高浓度的质量控制（QC）样品：40、400、4000 ng/mL中的提取回收率。如表4所示，siRNA在低、中、高三个浓度的提取回收率≥80%。

表4. 大鼠血浆中siRNA在质控样品中（QC）的提取回收率

QC浓度 (ng/mL)	提取后的 QC峰面积	空白基质加标的 峰面积	提取 回收率
40	7.13E+03	7.76E+03	92%
400	5.19E+04	6.50E+04	80%
40000	5.40E+05	6.47E+05	83%

结论

本实验采用Clarity OTX™ 96孔板固相萃取的前处理方法，通过X500B QTOF系统对大鼠血浆中siRNA进行定量。这种方法不仅可以提供目标寡核苷酸的定量信息，而且还可以得到杂质和代谢产物相关的信息。该方法检测限（LOD）达到1 ng/mL，定量限（LLOQ）为5 ng/mL；在5 ~10000 ng/mL的浓度范围内线性良好，且具有较好的重现性和准确度（RSD < 10%）；同时具有操作简单、快速分析的优点，提取回收率大于80%，具有较高的分析通量，为血浆基质中siRNA的定性和定量分析提供参考。

参考文献

1. 邓泮,钟大放,陈笑艳. LC/MS技术在寡核苷酸类药物生物样品定量分析和代谢物鉴定中的应用[J].质谱学报,2011,32(01):13-23+30.
2. Lakshmi Ramanathan, Helen Shen. LC-TOF-MS methods to quantify siRNAs and major metabolite in plasma, urine and tissues. Bioanalysis. 2019 Nov;11(21):1983-1992.

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。

© 2021 DH Tech. Dev. Pte. Ltd. RUO-MKT-02-12797-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：021-2419-7200
传真：021-2419-7333
官网：sciex.com.cn

广州分公司
广州市天河区珠江西路15号
珠江城1907室
电话：020-8510-0200
传真：020-3876-0835
官方微信：[ABSciex-China](https://www.absciex.com.cn)