

使用半自动固相萃取对GalNAc-siRNA偶联寡核苷酸进行LC-MS生物分析定量

Mary Trudeau, Kathryn Brennan

Waters Corporation

摘要

以下研究展示了Pipette+与Otto SPEcialist相结合用于GalNAc-siRNA偶联寡核苷酸半自动液体处理和固相萃取(SPE)的能力。使用Pipette+进行液体处理，使用Otto SPEcialist萃取生物样品，使用ACQUITY Premier BEH C₁₈寡核苷酸分析专用柱、ACQUITY Premier LC系统和Xevo TQ-XS质谱仪进行后续LC-MS/MS分析和定量。

优势

- 使用Otto SPEcialist正压萃取装置和Pipette+进行半自动样品前处理和萃取，减少用户间差异性，保障结果准确度和重现性
- Otto SPEcialist和Onelab软件简单易用，可轻松实现方法转换，使不同用户和不同实验室能够实施相同的前处理步骤
- ACQUITY Premier系统和ACQUITY Premier BEH C₁₈寡核苷酸分析专用柱搭载MaxPeak高性能表面(HPS)技术，能够减少寡核苷酸的金属吸附，进而降低方法检测限并提高重现性
- 从尿液和血浆提取物中准确灵敏地定量GalNAc-siRNA偶联寡核苷酸，LOD为1 ng/mL

简介

随着寡核苷酸药物(ONT)的相关研究和开发工作不断增加, 业界愈发需要更耐用、更灵敏且选择性更佳的样品前处理和LC-MS方法来评估这些药物。由于ONT的复杂性和多样性, 这类分析通常充满挑战。ONT具有多阴离子性质, 能够非特异性吸附在金属表面和生物样品中的蛋白质上, 进而导致分析物在生物样品前处理过程中损失, 以及在LC分析过程中与金属表面结合。此外, 科学家在手动制备样品时可能会出错, 造成更严重的目标分析物损失¹。所有这些不必要的相互作用都会导致色谱性能以及随后的质谱分析表现不佳且不一致。

本文所述研究介绍了各种生物基质中的GalNAc-siRNA偶联寡核苷酸(GalNAc)半自动样品前处理和萃取方法。使用Pipette+和Otto SPEcialist在混合模式弱阴离子交换吸附剂上进行样品前处理和固相萃取(SPE), 提供了一种半自动方法, 可以减少人为错误并提高分析回收率。半自动样品前处理结合ACQUITY Premier LC系统和BEH C₁₈寡核苷酸分析专用柱进行色谱分离, 通过减少金属吸附来改善分析结果, 最终提高GalNAc回收率。该方法实现了较高的寡核苷酸SPE回收率、低基质效应(≤10%), 并且对纯样品和萃取后加标的血浆和尿液样品实现了低浓度检测(ng/mL)。

实验

材料

GalNAc-siRNA偶联寡核苷酸由Alnylam Pharmaceuticals (美国马萨诸塞州剑桥) 提供; 寡聚脱氧核苷酸硫代磷酸酯(Gem132)由Nitto Denko AVECIA (美国马萨诸塞州米尔福德) 定制合成。样品前处理使用Sprague Dawley大鼠血浆(购自BIOIVT, 美国纽约韦斯特伯里) 或混合人尿进行。

样品前处理

用不含核糖核酸酶的水制备GalNAc和Gem132储备液, 浓度为1.0 mg/mL。制备Gem132的工作储备液作内标(IS)使用, 最终浓度为250 ng/mL。用流动相A制备GalNA的工作储备液, 浓度为10 µg/mL, 用于制备校准曲线和质控(QC)样品。用Pipette+和OneLab软件制备后加标校准曲线样品, 分析的最终浓度范围为2.0-1000 ng/mL (N=2); 并制备质控样品, 分析的最终浓度分别为7.5、75和750 ng/mL (N=4); 所有样品均用流动相A制备。在50 mM醋酸铵(pH 5.5)中, 分别在低浓度10 ng/mL (N=4)和高浓度1000 ng/mL (N=4)条件下进行纯样品的回收率实验。有关使用Oasis WAX µElution SPE的SPE步骤和200 µL空白血浆液-液萃取(LLE)的预处理步骤的方案信息可参见沃特世应用纪要[720007019ZH](#)²。对于尿液的样品预处理, 用50 mM醋酸铵(pH 5.5)按50:50稀释200 µL空白尿液。将SPE样品洗脱至搭载MaxPeak HPS技术的700 µL QuanRecovery 96孔板中, 用硅胶PTEE盖垫覆盖, 涡旋混合后提交LC-MS分析。从生物样品到分析的完整生物分析工作流程如图1所示。



Pipette+和OTTO SPEcialist上的WAX μ Elution SPE

使用Xevo TQ-XS和ACQUITY Premier进行LC-MS分析

图1. GalNAc-siRNA偶联寡核苷酸的生物样品前处理和LC-MS工作流程

LC-MS条件

液相色谱系统:	ACQUITY Premier系统
流动相A:	1%六氟异丙醇(HFIP) + 0.1% N,N-二异丙基乙胺(DIPEA)的水溶液
流动相B:	0.75%六氟异丙醇(HFIP) + 0.0375% N,N-二异丙基乙胺(DIPEA)的65%乙腈溶液
清除溶剂:	水:甲醇(90:10 v/v)
清洗溶剂:	乙腈:异丙醇:水:甲醇(25:25:25:25 v/v/v/v)
检测器:	Xevo TQ-XS

色谱柱: ACQUITY Premier BEH C₁₈寡核苷酸分析专用柱,
130 Å, 1.7 µm, 2.1 x 50 mm

柱温: 50 °C

样品温度: 8 °C

进样体积: 10 µL

流速: 0.6 mL/min

Gradient

时间 (min)	流速 (mL/min)	%A	%B	曲线
初始	0.600	95.0	5.0	6
3.50	0.600	75.0	25.0	6
4.00	0.600	10.0	90.0	6
4.50	0.600	95.0	5.0	6
5.00	0.600	95.0	5.0	6

MS设置

电离模式: ESI-

采集范围: MRM

毛细管电压: 2.00 kV

锥孔电压: 50 V

脱溶剂气温度: 500 °C

脱溶剂气流速:	1000 L/h
锥孔气流速:	150 L/h
碰撞气体流速:	0.2 mL/min
喷雾器气流:	7 bar

数据管理

仪器控制软件:	MassLynx 4.2版
定量软件:	TargetLynx

结果与讨论

使用Xevo TQ-XS MS (ESI-)进行LC-MS/MS定量分析。GalNAc和Gem132检测与定量分析所用的最终MRM通道（包括母离子和碎片离子）见表1。在检测过程中监测Gem132，确保整个实验过程的分析性能。分析使用搭载MaxPeak高性能表面(HPS)技术的ACQUITY Premier BEH C₁₈寡核苷酸分析专用柱，HPS技术专为尽可能减少非特异性金属与分析物（如寡核苷酸）相互作用而开发。本研究采用ACQUITY Premier LC系统和BEH C₁₈寡核苷酸分析专用柱确保了分析分离性能，改善了寡核苷酸回收率和检测限，同时减少了系统钝化和停机时间。

化合物	电荷	母离子(<i>m/z</i>)	子离子(<i>m/z</i>)	锥孔电压(V)	碰撞能量(eV)
GalNAc	(-11)	779.6	227.2	30	30
			430.1		18
Gem132	(-10)	659.3	94.80	30	30
			303.9		20
			319.0		20
			343.8		20

表1. GalNAc和Gem132寡核苷酸分析所用的最终MS条件

Otto SPEcialist是一款紧凑型半自动样品前处理装置，能够高效使用正压，同时在SPE过程的每个步骤中利用软件自动更改施加至吸附床的压力。图2显示了使用Otto SPEcialist和Oasis WAX μ Elution SPE萃取GalNAc的SPE萃取性能。其中纯溶液样品的浓度为10 ng/mL和1000 ng/mL（每个浓度下N=4），萃取步骤参考应用纪要[720007019ZH](#)所述方案。低浓度和高浓度下的平均SPE回收率分别为109.7%和88.6%，RSD值分别为9.97%和4.38%。这些结果表明，Oasis WAX μ Elution SPE板和所开发的方法能够使GalNAc在固定相上实现足够的保留，而Otto SPEcialist能够提供较高的回收率且样品间差异非常小。

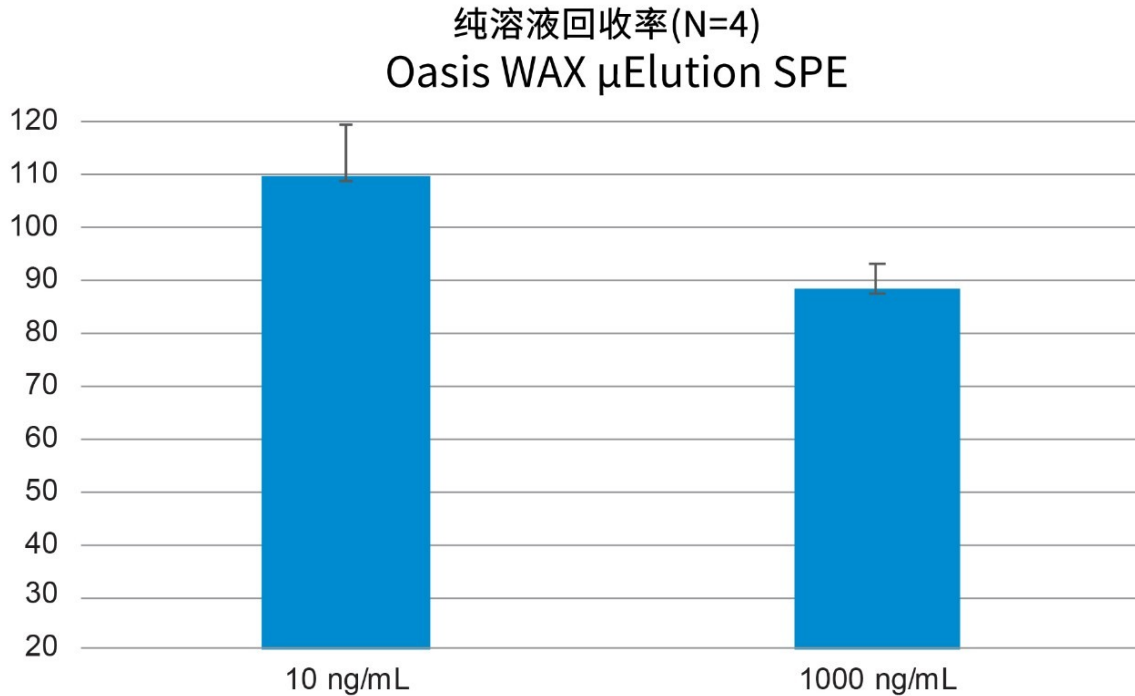


图2.使用Oasis WAX μ Elution 96孔SPE提取板和Otto SPEcialist获得的10 ng/mL和1000 ng/mL GalNAc纯溶液SPE回收率

对于生物基质中的GalNAc，ACQUITY Premier HPS技术结合半自动样品前处理和萃取确保了线性、准确和可重现的定量性能。图3展示了萃取后加标血浆样品的定量性能，LOD低至1 ng/mL，线性动态范围在2.0-1000 ng/mL之间（ R^2 值为0.996 1/x加权回归）。准确度范围为86.2–117%。图4展示了萃取后加标尿液样品的定量性能，LOD低至1.0 ng/mL，动态范围在5-1000 ng/mL之间（ R^2 值为0.996 1/x加权回归）。准确度范围为85.9–119%。该数据满足监管机构对于准确度($\pm 20\%$)和精密度($\pm 20\%$)的法规要求， R^2 值 $\geq 0.980^3$ 。

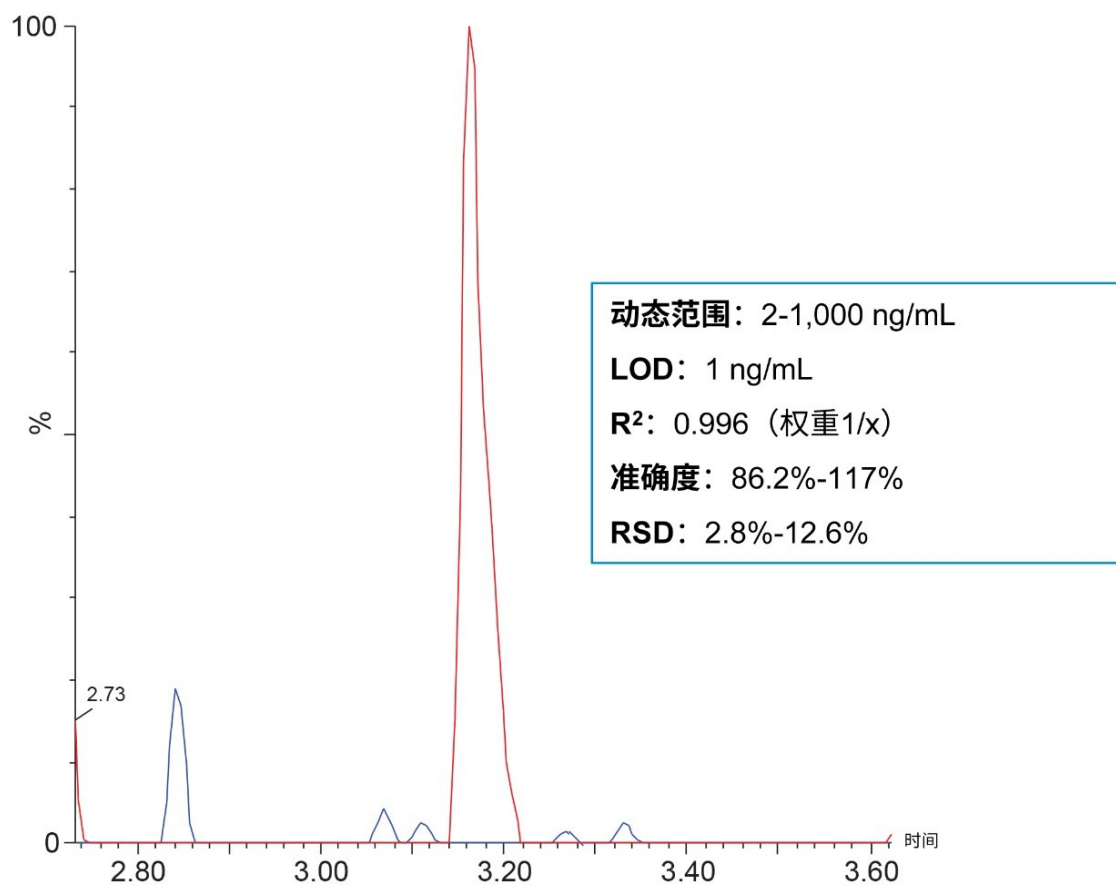


图3.萃取后加标血浆的定量性能, LOD低至1 ng/mL。

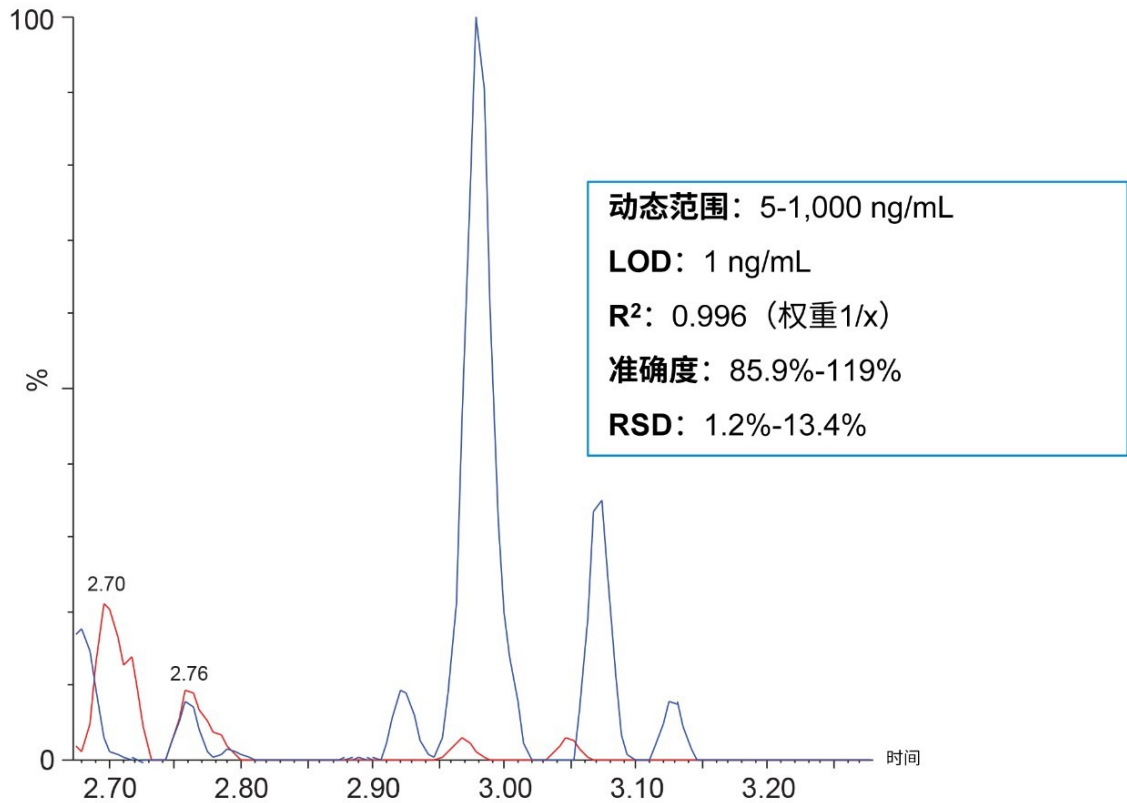


图4.萃取后加标尿液的定量性能，LOD低至1 ng/mL。

Pipette+的控制采用基于OneLab软件的用户友好型浏览器。通过OneLab创建和运行移液方法，确保日间和用户间的样品前处理稳定、可靠且可重现。Pipette+所遵循的移液步骤源自OneLab创建的系列稀释方法。该方法使用Pipette+制备生物基质的校准曲线样品和QC样品。要萃取并分析大鼠血浆，需制备3个不同批次的校准曲线样品和QC样品（日间）。日间和日内QC准确度和RSD见表2。日间准确度范围为90.8–106.8%，RSD为2.2–13.9%。日内（第3天）准确度范围为92.4–113.7%，RSD为1.1–12.6%。要萃取并分析混合人尿样，需制备2个不同批次的日间校准曲线样品和QC样品。日间和日内QC准确度和RSD见表3。日间准确度范围为93.8–111.4%，RSD为3.3–13.4%。日内（第1天）准确度范围为90.2–109.3%，RSD为2.7–11.9%。使用Pipette+和OneLab制备QC样品确保了优异的性能，并使不同批次的萃取后加标样品获得准确且可重现的结果。

日间(N=3)血浆准确度和RSD				
ID	浓度 (ng/mL)	计算浓度 (ng/mL)	准确度(%)	%RSD
QC1	7.50	7.60	101	13.9
QC2	75.0	68.1	90.8	3.69
QC3	750	801	107	2.23
日内(N=4)第3天血浆准确度和RSD				
ID	浓度 (ng/mL)	计算浓度 (ng/mL)	准确度(%)	%RSD
QC1	7.50	6.95	92.4	12.6
QC2	75.0	74.3	99.0	1.12
QC3	750	853	114	2.14

表2.用Pipette+制备、Otto SPecialist萃取的后加标血浆样品的日间和日内QC统计

日间(N=2)尿液准确度和RSD				
ID	浓度 (ng/mL)	计算浓度 (ng/mL)	准确度(%)	%RSD
QC1	7.50	7.99	106	13.4
QC2	75.0	70.4	93.8	3.32
QC3	750	835	111	3.60
日内(N=4)第3天血浆准确度和RSD				
ID	浓度 (ng/mL)	计算浓度 (ng/mL)	准确度(%)	%RSD
QC1	7.50	7.18	95.6	11.9
QC2	75.0	67.7	90.2	2.73
QC3	750	819	109	4.10

表3.用Pipette+制备、Otto SPecialist萃取的后加标尿液样品的日间和日内QC统计

结论

本应用的亮点在于成功从纯溶液和萃取后加标血浆和尿液中完成GalNAc-siRNA偶联寡核苷酸的SPE萃取和LC-MS/MS定量分析。使用Pipette+和Otto SPEcialist简化了样品前处理和萃取步骤，大幅提高生产率、减少误差，并确保方法的整体分析性能。ACQUITY Premier LC系统和BEH C₁₈寡核苷酸分析专用柱经专门设计，旨在减少金属敏感分析物的吸附，确保持续高水平的寡核苷酸回收率。该方法对血浆和尿液提取物中GalNAc-siRNA偶联寡核苷酸的分析灵敏度低至1 ng/mL LOD。

致谢

本文作者由衷感谢Greg Jones和Alnylam Pharmaceuticals为我们的实验无偿提供21 mer GalNAc寡核苷酸。

参考资料

1. Chapter 5 Automation Tools and Strategies for Bioanalysis, in Progress in Pharmaceutical And Biomedical Analysis, David A. Wells, Editor 2003, Elsevier.p. 135–197.
2. Brennan,K, *et al.*, 使用MaxPeak高性能表面技术改善寡核苷酸的SPE-LC-MS分析性能.沃特世应用纪要, [720007019ZH](#), 2020
3. Bansal, S.; DeStefano, A. Key Elements of Bioanalytical Method Validation for Small Molecules.*The AAPS Journal* 2007, 9 (1), E109–E114.

特色产品

- [ACQUITY Premier系统 <https://www.waters.com/waters/nav.htm?cid=135077739>](https://www.waters.com/waters/nav.htm?cid=135077739)
- [Xevo TQ-XS三重四极杆质谱仪 <https://www.waters.com/134889751>](https://www.waters.com/134889751)
- [MassLynx MS软件 <https://www.waters.com/513662>](https://www.waters.com/513662)
- [TargetLynx <https://www.waters.com/513791>](https://www.waters.com/513791)
- [Otto SPEcialist正压萃取装置 <https://www.waters.com/waters/nav.htm?cid=135073532>](https://www.waters.com/waters/nav.htm?cid=135073532)

- [Oasis样品萃取产品 <https://www.waters.com/waters/nav.htm?cid=513209>](https://www.waters.com/waters/nav.htm?cid=513209)

720007418ZH, 2021年10月



© 2022 Waters Corporation. All Rights Reserved.