

SCIEX Triple Quad™ 系统定量分析大鼠血浆中的siRNA药物 Inclisiran

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

冷向阳, 钟晨春, 龙志敏, 刘冰洁

Xiangyang Leng, Chenchun Zhong, Zhimin Long, Bingjie Liu

SCIEX应用支持中心, 中国

Key words: SCIEX Triple Quad™ System; siRNA; Inclisiran; Quantitative analysis; Plasma; MRM; Oligo nucleotides.

引言

siRNA (small interfering RNA, 小干扰RNA) 是一种长度约 20-25 个碱基的双链RNA分子, 通过RNA干扰 (RNAi) 机制特异性沉默靶基因的表达, siRNA进入细胞后, 与RNA诱导沉默复合体 (RISC) 结合。siRNA双链解旋, 其中引导链引导RISC识别互补的靶mRNA并切断靶mRNA, 阻断特定基因翻译, 抑制基因表达。Inclisiran (商品名: 乐可为) 于2020年上市, 是全球首款靶向 PCSK9 蛋白的siRNA药物, 主要用于治疗成人原发性高胆固醇血症或混合型血脂异常。其核心机制是通过RNA干扰技术特异性沉默 PCSK9 mRNA 的表达, 从而降低低密度脂蛋白胆固醇 (LDL-C) 水平, 减少心血管疾病风险

本文建立了使用SCIEX Triple Quad™系统对大鼠血浆中siRNA药物 Inclisiran 的定量分析的方法, 采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 Inclisiran 在血浆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 Inclisiran, 反义链和正义链的定量下限LLOQ分别为0.5 ng/mL和 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

Inclisiran标准品 (正义链SS分子式: $C_{292}H_{416}F_2N_{75}O_{182}P_{21}S_2$, 分子量: 8636.9; 反义链AS分子式: $C_{237}H_{291}F_{10}N_{101}O_{134}P_{22}S_4$, 分子量: 7694.2); 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

Inclisiran标准品使用pH 8.0的10 mM Tris-HCl 溶液 (含1 mM 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. 大鼠血浆SPE处理流程

步骤	溶剂
样品预处理	血浆100 μL+100 μL裂解液+200 μL 50 mM醋酸铵
活化	1mL*2； 100%甲醇
平衡	1mL×2； 平衡液或用50 mM醋酸铵， pH 5.5
上样	400 μL； 3-5秒一滴
淋洗	1mL×3； 淋洗液或用50mM醋酸铵pH 5.5, 50%乙腈
洗脱	500 μL ×2； 100 mM pH 9.5 碳酸氢铵： 乙腈（ 8:2 ）
吹干	N ₂ ， 30℃吹干
复溶	100 μL, pH 8.0的10 mM Tris-HCl 溶液（ 含1mM EDTA ）

3. 液相方法

色谱柱： Premier BEH C18 1.7 μm, 100 × 2.1 mm

流动相：

A相： 水 (含100 mM 六氟异丙醇, 15 mM N,N-二异丙基乙胺)

B相： 乙腈 (含100 mM 六氟异丙醇, 15 mM N,N-二异丙基乙胺)

流速： 0.4 mL/min

柱温： 65℃；

流动相梯度：

4. 质谱方法

离子源： ESI源， 负离子模式

离子源参数：

Time(min)	A (%)	B (%)
0.00	90	10
0.50	90	10
3.00	60	40
4.00	10	90
4.50	10	90
4.60	90	10
6.00	90	10

表2. Inclisiran的质谱参数

化合物名称	Q1 Mass	Q3 Mass	DP	CE	EP	CXP
AS-Inclisiran	768.8	358.1	-60	-42	-10	-15
SS-Inclisiran	863.1	430.1	-60	-30	-10	-15

电喷雾电压IS: -4500 V

雾化气 GS1: 55 psi

碰撞气 CAD: 12

气帘气 CUR: 35 psi

辅助加热气GS2: 55 psi

源温度 TEM: 400℃

实验结果

1. 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 ）分别为AS链0.5 ng/mL， SS链0.2 ng/mL， 空白中无干扰，方法选择性好，灵敏度高；定量下限样品连续重复进样6针， RSD%<3.57%， 重复性良好。

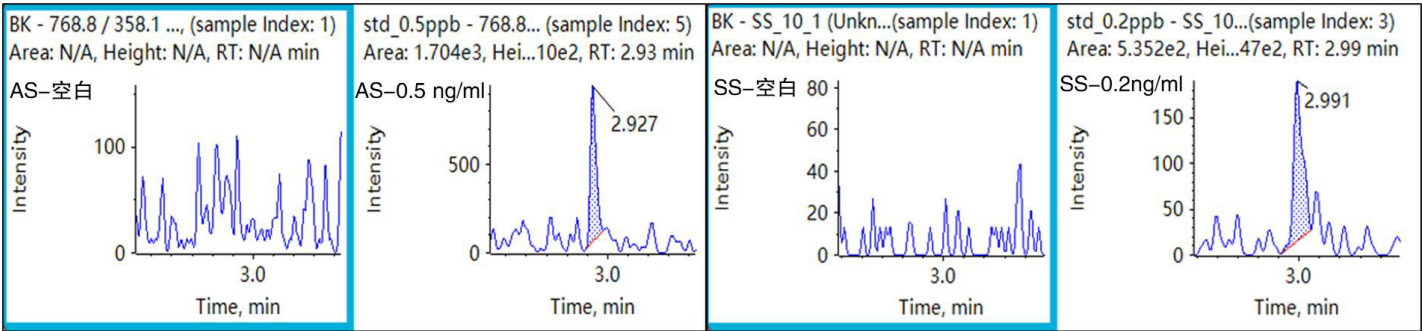


图1. Inclisiran在空白血浆样品和LOQ的典型色谱图

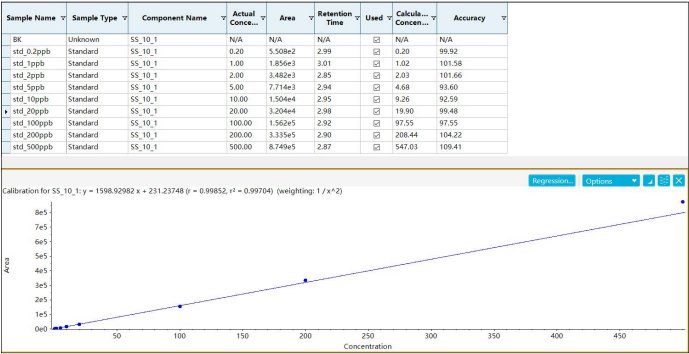


图2. 大鼠血浆中Inclisiran的反义链标准曲线图

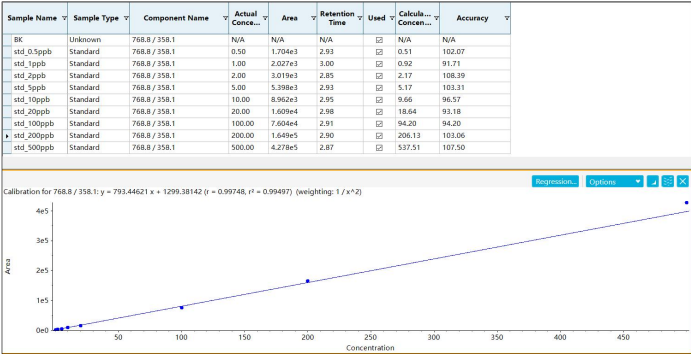


图3. 大鼠血浆中Inclisiran的正义链标准曲线图

2. 线性范围：在大鼠血浆中Inclisiran的AS链和SS链在线性范围0.5-500ng/ml和0.2-500 ng/mL内线性关系良好，相关系数均大于0.997，标曲各点准确度均在91.7%-109.4%之间。
3. 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Inclisiran在低、高浓度下的提取回收率和基质效应。结果见表3。Inclisiran的反义链和正义链在5 ng/ml和50 ng/ml 浓度下的提取回收率为70.0% - 74.9%，基质效应为72.4% - 79.7%。

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
AS_5	5398	7197	9347	74.9%	76.9%
SS_5	7621	10733	14123	71.0%	75.9%
AS_50	36275	51823	71582	70.0%	72.4%
SS_50	77872	106772	133878	72.9%	79.7%

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Inclisiran进行定量分析。同时对反义链和正义链定量，定量下限分别为0.5 ng/mL和0.2 ng/mL，在线性范围0.5-500 ng/mL和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70%，基质效应大于72%，可以满足目标Inclisiran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。

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。

© 2025 DH Tech. Dev. Pte. Ltd. RUO-MKT-02-35199-ZH-A