

利用SCIEX QTOF 系统中SWATH® 采集方法建立大鼠血浆中DSPE-MPEG2000的药代动力学方法

Pharmacokinetics Analysis of DSPE-MPEG2000 in Rat plasma by SCIEX QTOF System with SWATH® acquisition

雷敏, 龙志敏, 郭立海

Lei Min, Long Zhimin, Guo Lihai

SCIEX, 中国

Key word: Quantitation, LNP (Lipid nanoparticles), DSPE-MPEG2000, pharmacokinetics, SCIEX QTOF System, SWATH® acquisition

引言

脂质纳米粒(LNP)广泛用于小分子和核酸药物的递送,近年来因其作为COVID-19mRNA疫苗递送平台的巨大成功而备受关注^[1]。目前,经典的LNP的脂质成分通常包括四种:可电离脂质(或阳离子脂质)、辅助脂质,胆固醇,聚乙二醇化脂质(PEG-脂质)^[1]。然而,疫苗在接种过程中陆续报道出现了一些不良反应,导致这些副作用的原因还未揭示清楚,越来越多的研究表明:可能与LNP载体材料有关。根据当前披露的信息,大部分研究关注于疫苗的生物效应,对疫苗所含有的LNP脂质载体材料尤其是PEG化脂质在机体内的吸收,分布,代谢和排泄过程尚未研究清楚。因此,建立PEG化脂质的体内定量分析方法,并深入研究其在机体内的药代动力学过程是非常必要的,对LNP载体材料的安全性评价具有重大意义^[2]。

PEG-脂质为一系列不同聚合度的混合物,如DSPE-MPEG2000呈现分子量以2500为中位数的正态分布(DSPE-MPEG2000结构式见图3),如果对其中的单一成分定量,不能全面的表征该类混合物在体内的药代动力学行为。目前,已有文献^[3]报道使用SCIEX TripleTOF 5600 MS/MS^{All}方法建立PEG2000及其PEG化药物药代的动力学研究方法。以该文献中的PEG2000混合物为例,将其分布范围内的所有母离子进行TOF MS全扫,并设置较高的碰撞能量(CE),使所有的母离子均碎裂成共有的碎片(如m/z 89.0261, 133.0834, 177.1073),最后提取共有碎片进行定量,即对所有不同

分子量成分进行了全面定量,以此实现对该类混合物在体内的全面定量需求。SCIEX QTOF系统中的SWATH®采集方法可将一段范围的母离子分成N个窗口,不同窗口的母离子依次进入Q2碰撞后产生碎片,最终提取不同窗口产生的共有碎片并进行加和后定量,同样可以实现这类混合物的药代动力学定量需求。SWATH®采集方法与MS/MS^{All}采集方法相比,因可在不同的窗口设置其最佳的去簇电压(DP)和碰撞能量(CE),从而提高定量灵敏度。

DSPE-MPEG2000是比较常用的一种PEG-脂质,因此本方案在SCIEX高效液相串联飞行时间质谱仪上采用SWATH®采集方法建立液质方法和前处理方法为血浆中测定DSPE-MPEG2000提供参考。

本文中实验方法特点

本方法使用SCIEX QTOF 系统中SWATH®采集方法进行定量,方法特点如下:

- 1、该方案使用SCIEX QTOF 系统中SWATH®采集方法建立5 min 色谱梯度,以实现更全面定量分析这类系列混合物的目的。
- 2、方法灵敏度高(血浆中定量下限LOQ: 1 ng/mL);标准溶液线性范围宽(1~1000 ng/mL);线性关系良好(相关系数0.997);低、中、高不同浓度的样本重现性好(RSD均在4.34%以内),表明仪器和方法重现性好。
- 3、该方案中包含的液质条件和前处理方法均可为血浆中测定DSPE-MPEG2000提供参考。

实验方法

1、仪器设备

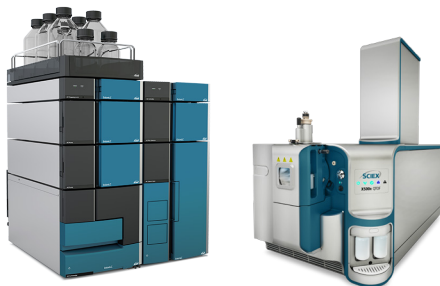


图1. ExionLC™ AE系统和SCIEX QTOF系统

2、液相条件

液相: SCIEX ExionLC™ AE系统

色谱柱: Phenomenex luna Omega PS C18(4.6 × 100 mm, 3 μm)

流动相: A相: 水:甲醇:乙腈=2:1:1(含 1 mmol/L乙酸铵)

B相: 异丙醇(含 1 mmol/L乙酸铵)

流速: 0.6 mL/min

柱温: 40 °C

梯度洗脱程序如表1:

表1. 液相梯度条件

时间 (min)	A%	B%
0	55	45
2.0	5	95
3.5	5	95
3.6	55	45
5.0	55	45

3、质谱条件

SCIEX QTOF系统

离子源: 电喷雾离子源ESI源, 正离子模式

采集方式: SWATH® 采集方法

离子源参数

电喷雾电压: 4000 V

气帘气 CUR: 35 psi

雾化气 GAS1: 45 psi

雾化气 GAS2: 60 psi

源温度 TEM: 450 °C

SWATH® 采集方法建立过程:

经X500 QTOF 结合IDA(信息依赖采集方式)+DBS(动态背景扣除)采集方式测试DSPE-MPEG2000标液后, 发现该类成分分子量主要在2200-3000左右, 且以带2-4个电荷为主(以加铵峰为主), 见图2中一级谱图, 因此最终母离子的质荷比范围在600-1500。该类化合物碎裂后均能产生碎片m/z 607.5665, 见图2中二级谱图, 因此

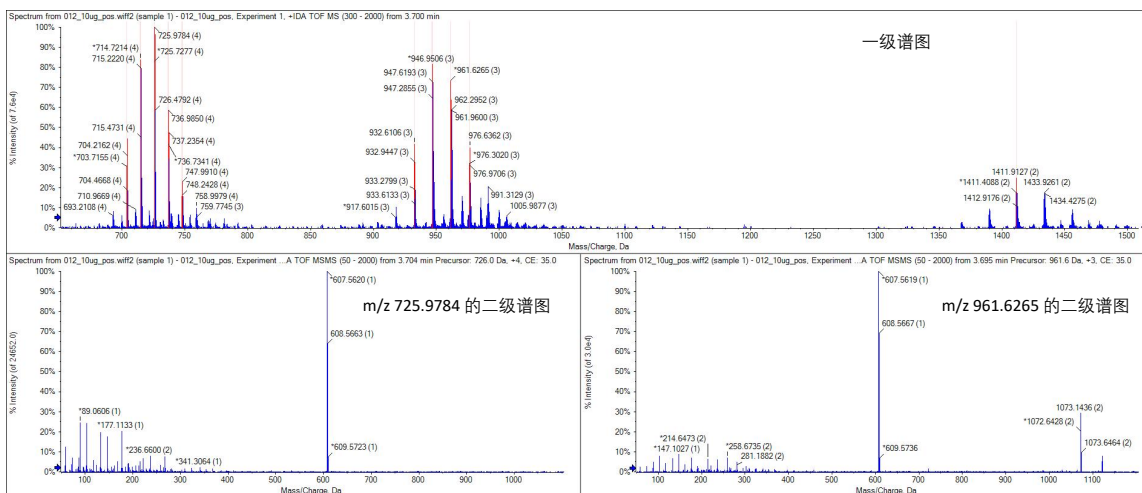


图2. DSPE-MPEG2000中部分化合物一级谱图和二级谱图

建立SWATH® 采集方法，将在600-1500的质荷比分成12个窗口，每一段窗口的母离子依次进入Q2，碎裂后均产生碎片m/z 607.5665，最终SCIEX OS软件将所有质荷比为607.5665的碎片信号进行加和和定量，即对DSPE PEG2000的一系列不同分子量的混合物进行了全面的定量。

化合物结构式及碎片断裂位置，图3：

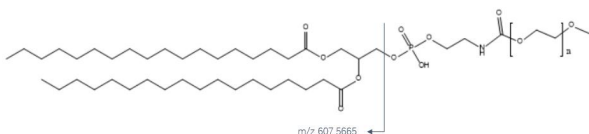


图3. DSPE-MPEG2000结构式（n表示乙二醇聚合的数目）

结合母离子质荷比范围分成12个窗口，每个质荷比窗口均优化最佳的DP和CE，最终SWATH®采集方法如图4：

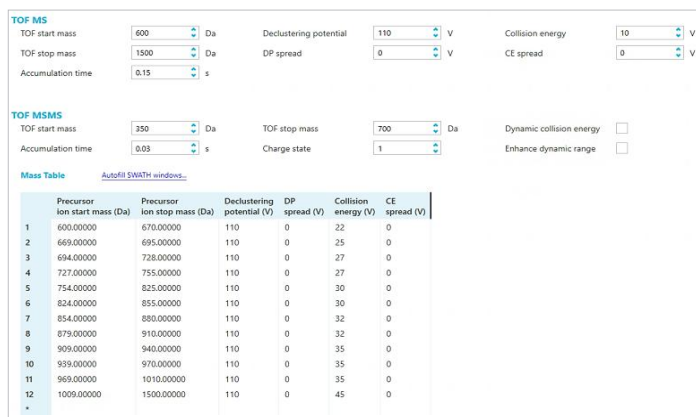


图4. SCIEX OS软件中SWATH®采集方法

4、实验结果

灵敏度和线性考察

空白血浆、1 ng/mL和1000 ng/mL 标准溶液典型谱图见图5。从图5可以看出，空白血浆中无干扰，表明方法专属性好，特异性高。血浆LOQ 可低至1 ng/mL，表明仪器灵敏度高。该色谱条件下，色谱峰峰形良好。

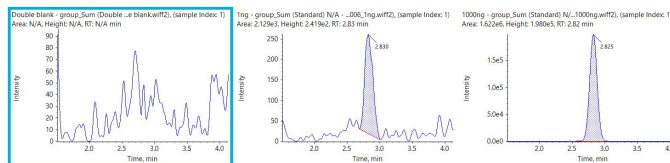


图5. 典型色谱图（从左到右，分别为空白血浆、1 ng/mL和1000 ng/mL标准溶液）

以70%乙醇作为溶剂配制不同浓度的标准溶液，并将标准溶液分别加入至一定量的大鼠血浆中，最终配制血浆浓度分别为1, 2, 5, 10, 50, 100, 500, 1000 ng/mL。

前处理流程：分别取血浆标曲样本50 μl，加入350 μl乙腈，涡旋混匀，高速离心，取上清液进LC-MS/MS系统进行分析。

不同浓度的峰面积及线性回归方程见图6。从图6可见，1~1000 ng/mL的浓度范围内，线性相关系数0.997，表明仪器的线性范围宽，且线性关系良好。不同浓度的回收率均在88.0-114.7%（见图6中Accuracy列），满足生物样本对准确性的要求，表明仪器和方法的准确性高。

Index	Sample Name	Sample Type	Component Name	Component Type	Actual Conc.	Area	Height	Retenti... Time	Used	Calculated Concentration	Accuracy	Adduct / Cha...	Retent... Time
13	Solvent	Solvent	group_Sum	Quantifiers	N/A	N/A	N/A	N/A	☑	N/A	N/A		N/A
26	Double blank	Double Blank	group_Sum	Quantifiers	N/A	N/A	N/A	N/A	☑	N/A	N/A		N/A
39	1ng	Standard	group_Sum	Quantifiers	1.00	2.129e3	2.419e2	2.83	☑	1.147	114.68		0.01
52	2ng	Standard	group_Sum	Quantifiers	2.00	3.719e3	4.975e2	2.83	☑	2.082	104.08		0.01
65	5ng	Standard	group_Sum	Quantifiers	5.00	7.699e3	9.307e2	2.81	☑	4.405	88.09		0.01
78	10ng	Standard	group_Sum	Quantifiers	10.00	1.370e4	2.196e3	2.84	☑	9.949	99.49		0.02
91	50ng	Standard	group_Sum	Quantifiers	50.00	7.856e4	9.317e3	2.83	☑	46.173	92.35		0.01
104	100ng	Standard	group_Sum	Quantifiers	100.00	1.615e5	2.017e4	2.81	☑	95.022	95.02		0.01
117	500ng	Standard	group_Sum	Quantifiers	500.00	9.399e5	1.200e5	2.83	☑	553.597	110.72		0.01
130	1000ng	Standard	group_Sum	Quantifiers	1000.00	1.822e6	1.880e5	2.82	☑	956.627	95.56		0.01

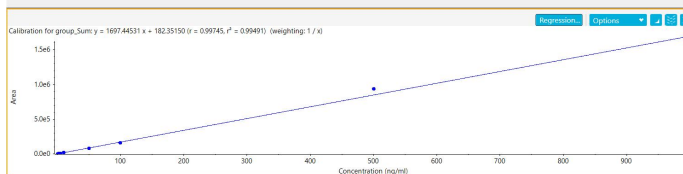


图6. 标准曲线和线性回归方程，线性相关系数 0.997

重现性

为考察方法和仪器的重现性，将标准溶液中的低、中、高3个不同浓度点分别重复进样3次，计算RSD。不同浓度的RSD均在4.34%以内（见图7中Percent CV列），远满足方法学中对重复性要求，表明仪器和方法的重现性好。

Index	Sample Name	Sample Type	Component Name	Component Type	Actual Concentration	Area	Height	Retention Time	Used	Calculated Concentration	Accuracy	Adduct / Charge
182	5ng	Quality Control	group_Sum	Quantifiers	5.00	7.156e3	8.099e2	2.82	<input checked="" type="checkbox"/>	4.108	80.17	
195	5ng	Quality Control	group_Sum	Quantifiers	5.00	7.783e3	9.200e2	2.81	<input checked="" type="checkbox"/>	4.479	89.57	
208	5ng	Quality Control	group_Sum	Quantifiers	5.00	7.625e3	7.473e2	2.82	<input checked="" type="checkbox"/>	4.384	87.69	
221	50ng	Quality Control	group_Sum	Quantifiers	50.00	7.511e4	9.101e3	2.81	<input checked="" type="checkbox"/>	44.139	88.28	
234	50ng	Quality Control	group_Sum	Quantifiers	50.00	7.725e4	9.216e3	2.81	<input checked="" type="checkbox"/>	45.403	90.81	
247	50ng	Quality Control	group_Sum	Quantifiers	50.00	7.615e4	9.415e3	2.82	<input checked="" type="checkbox"/>	44.753	89.51	
260	500ng	Quality Control	group_Sum	Quantifiers	500.00	8.759e5	1.000e5	2.81	<input checked="" type="checkbox"/>	515.823	100.16	
273	500ng	Quality Control	group_Sum	Quantifiers	500.00	8.690e5	1.009e5	2.81	<input checked="" type="checkbox"/>	511.813	102.36	
286	500ng	Quality Control	group_Sum	Quantifiers	500.00	8.600e5	1.054e5	2.81	<input checked="" type="checkbox"/>	506.559	101.31	

Row	Component Name	Actual Concentration	Num. Values	Mean	Standard Deviat.	Percent CV	Value #1	Value #2	Value #3
1	group_Sum	5.00	3 of 3	7.522e3	2.287e2	4.84	7.156e3	7.783e3	7.625e3
2	group_Sum	50.00	3 of 3	7.617e4	1.073e4	1.41	7.511e4	7.725e4	7.615e4
3	group_Sum	500.00	3 of 3	8.683e5	7.886e3	0.91	8.758e5	8.690e5	8.600e5

图7. 不同浓度点峰面积、保留时间及RSD结果列表

5、结论

该方案采用SCIEX QTOF 系统中SWATH® 采集方法建立5 min 色谱梯度，实现高通量及全面定量该类系列混合物，以更全面的了解其体内药代动力学行为。该方法中空白血浆无干扰，专属性好，特异性高；血浆LOQ低至1 ng/ml，表明仪器灵敏度高；线性范围为1 -1000 ng/ml，线性范围宽，线性关系良好；不同浓度点重复进样的RSD均在4.34%以内，表明仪器和方法的重现性和稳定性好。该方案中包含的液质条件和前处理方法为纳米脂质体药物中DSPE-MPEG2000的血药浓度检测提供参考。

参考文献和资料

- [1]. 深度解析脂质纳米粒(LNP)如何递送RNA药物，教你如何按需设计LNP! <https://zhuanlan.zhihu.com/p/470589382>
- [2]. 庞伊伶, 脂质纳米粒载体材料DMG-PEG2000 的药代动力学研究, 硕士论文。
- [3]. H. Sun, Q. Zhang, Z. Zhang, J. Tong, D. chu, J. Gu, Simultaneous Quantitative Analysis of Polyethylene glycol (PEG), PEGylated Paclitaxel and Paclitaxel in Rats By MS/MSALL Technique with Hybrid Quadrupole Time-of-Flight Mass Spectrometry, Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. DOI: <http://dx.doi.org/doi:10.1016/j.jpba.2017.06.053>.

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。

© 2024 DH Tech. Dev. Pte. Ltd. MKT-31748-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: 021-2419-7201
传真: 021-2419-7333

官网: sciex.com.cn

广州办公室
广州国际生物岛星岛环北路1号
B2栋501、502单元
电话: 020-8842-4017

官方微信: [SCIEX-China](https://www.sciex.com.cn)