

核酸医薬品の高感度分析_LC-MS/MSによるアプローチ

High-sensitivity analysis of therapeutic oligonucleotides using an LC-MS/MS approach

株式会社新日本科学 つくば分析ラボラトリ
○ 千田 直人、墳崎 靖子、三上 貴宏

Naoto Senda, Yasuko Tsukazaki and Takahiro Mikami
Tsukuba Bioanalysis Laboratory, Shin Nippon Biomedical Laboratories, Ltd.

- 高感度化をもたらした因子 (67th ASMS発表内容から)
 - イオンランジションの選択
 - HPLC条件
- マトリックスに応じた前処理方法
 - 血漿と臓器 (腎臓・肝臓)

A highly selective and sensitive analytical method using LC-MS/MS for phosphorothioate oligonucleotide

Yasuko Tsukazaki, Naoto Senda
Kaoru Karasawa, Moriyuki Iwasaki
Fumito Wada, Mariko Harada-Shiba

- Tsukuba Bioanalytical Laboratory, Shin Nippon Biomedical Laboratories, Ltd., TCI D-18, 2-1-6 Sengen, Tsukuba, Ibaraki 305-0047, Japan
 - SCIEX, 4-7-35 Kita shinagawa, Shinagawa-ku, Tokyo 140-0001, Japan
 - National Cerebral and Cardiovascular Center Research Institute, 24 Kishibe-shinmachi, Suita, Osaka 564-0018, Japan

Introduction

Many bioanalytical methods for phosphorothioate oligonucleotides have been developed to keep up with the pace of drug development needs. LC-MS/MS is one of the most popular techniques due to its unprecedented specificity; however, the sensitivity for most LC-MS/MS assays is still not as good as corresponding ligand binding assay for some large oligonucleotide therapeutics. To improve sensitivity and throughput, we have successfully developed highly sensitive LC-MS/MS method.

Target article

LNA (14 mer, mw: 4572.6), a phosphorothioate oligonucleotide (this chemical structure is confidential), provided from National Cerebral and Cardiovascular Center Research Institute.

Results

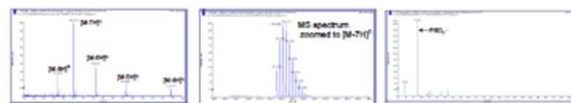


Fig. 1. TOF-MS spectra of LNA



Fig. 2. Product scan spectrum of LNA
product scan from m/z 652.06 (7-valent)

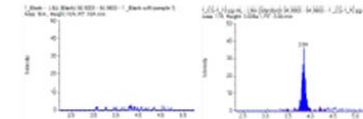


Fig. 4. Typical SRM (high resolution) chromatograms of calibration sample
left figure; 0 pg/mL, right figure; 10.0 pg/mL as LLOQ

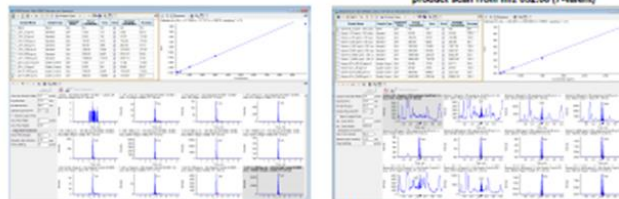


Fig. 3. Quantitation results of between-run [1st]
left figure; TripleTOF 5600+, right figure; TripleQuad 5500

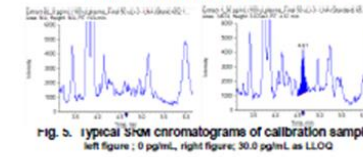


Fig. 5. Typical SRM chromatograms of calibration sample
left figure; 0 pg/mL, right figure; 30.0 pg/mL as LLOQ

Methodology

Pretreatment;
 A 100 μ L of 1 mol/L TEAA^a (pH 8.4) and 10 μ L of 0.05% TEA were added to 100 μ L of rat plasma and stirred. For preparation of a standard curve, LNA was dissolved in 0.05% TEA^b, and 10 μ L thereof was added to 100 μ L of rat plasma. When using the Triple TOF 5600+ as was quantitation device, the final concentrations in rat plasma were set 10, 30, 100, 300, 1000, 3000 and 10000 pg/mL. When using the Triple Quad 5500 as a quantifier, the final concentrations in rat plasma were set 30, 100, 300, 1000, 3000, 10000 and 30000 pg/mL.

For the solid phase extraction, 30 μ m (30 mg) of the OASIS HLB 90-well extraction plate was used. Apply 1.0 mL of acetonitrile to each well in the plate, followed by 1 mol/L TEAA (pH 8.4). After activation and equilibration, rat plasma mixed with 1 mol/L TEAA (pH 8.4) was applied to each well. Washing the plate with 2 mL of Milli-Q water, phosphorothioate oligonucleotide was eluted using 0.3 mL of 50% acetonitrile aqueous solution. This elution was evaporated to dryness under nitrogen stream at 50°C. After dryness, residue was reconstituted by 50 μ L of 0.05% TEA.

Measurement;
 LC-MS/MS conditions
 Ionization and polarity / ESI, negative

device	ion transition (m/z)	collision energy (V)
TripleTOF 5600+	652.06 ^c to 94.93	-77.0
TripleQuad 5500	652.1 ^d to 94.9	-103.0

^a multivalent ion; 7-valent

HPLC conditions
 Column : CADENZA CD-C18, 3 μ m, 2.0 \times 50.0mm (Imtakt)
 Column oven temp. : 60°C
 Mobile phase A : 50 mmol/L HFIP^e and 10 mmol/L DIPEA^f aqueous solution
 Mobile phase B : acetonitrile
 Gradient program :

run time (min)	mobile phase B%
0.50	5
3.00	15
6.00	15
6.10	99
7.00	99
7.01	5
8.50	stop

Injection volume : 15 μ L (TripleTOF 5600+), 5 μ L (TripleQuad 5500)

^a TEAA = Triethylamine Acetate
^b TEA = Triethylamine
^c HFIP = 1,1,1,3,3,3-Hexafluoro-2-propanol
^d DIPEA = N,N-diisopropylethylamine (Höngig's base)

Table 1. Between-run repeatability (TripleTOF 5600+)

concentration (pg/mL)	CV (%)	CV (%)	CV (%)	CV (%)	CV (%)	CV (%)	CV (%)	CV (%)	CV (%)
10	1.5	1.2	1.1	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
30	1.5	1.2	1.1	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
100	1.5	1.2	1.1	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
300	1.5	1.2	1.1	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
1000	1.5	1.2	1.1	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
3000	1.5	1.2	1.1	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
10000	1.5	1.2	1.1	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0

Table 2. Between-run repeatability (TripleQuad 5500)

concentration (pg/mL)	CV (%)	CV (%)	CV (%)	CV (%)	CV (%)	CV (%)	CV (%)	CV (%)	CV (%)
10	1.5	1.2	1.1	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
30	1.5	1.2	1.1	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
100	1.5	1.2	1.1	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
300	1.5	1.2	1.1	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
1000	1.5	1.2	1.1	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
3000	1.5	1.2	1.1	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
10000	1.5	1.2	1.1	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0

Table 3. Plasma concentration (μ g/mL) of 10 mg/kg LNA administered subcutaneously

The 0.5, 1, 2, 6 hour samples were diluted 10000-fold and the 24 hour samples were diluted 100-fold with rat plasma

animal No.	quantitative dilution	time after administration (hour)					
		0	0.5	1	2	6	24
42	TripleTOF 5600+	BLOQ	5.94	3.55	3.34	0.478	0.0152
	TripleQuad 5500	ND	5.17	3.45	3.34	0.484	0.0153
	TripleTOF 5600+	BLOQ	5.77	2.02	4.80	0.542	0.0319
43	TripleTOF 5600+	BLOQ	5.77	2.02	4.80	0.542	0.0319
	TripleQuad 5500	ND	5.17	1.90	4.58	0.485	0.0340
	TripleTOF 5600+	BLOQ	5.98	4.37	3.01	0.631	0.0349
44	TripleTOF 5600+	BLOQ	5.98	4.37	3.01	0.631	0.0349
	TripleQuad 5500	ND	5.98	4.32	2.91	0.573	0.0337
	TripleTOF 5600+	BLOQ	5.98	4.32	2.91	0.573	0.0337

BLOQ, below lower limit of quantification, ND, not detected

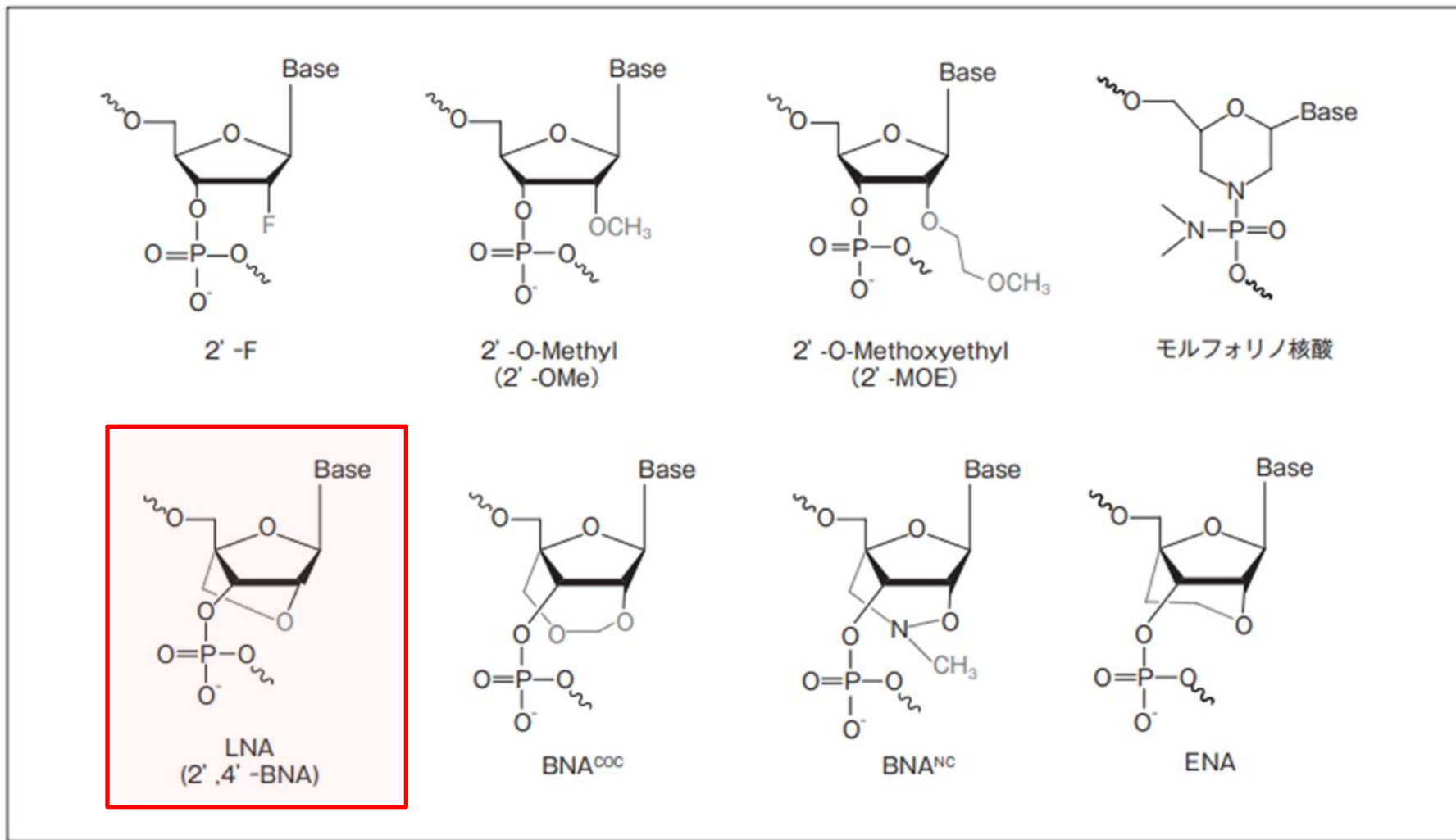
Discussion

The highly sensitive assay for phosphorothioate oligonucleotide using LC-MS/MS was developed in this presentation. The first consideration in increasing sensitivity was the choice of precursor ion. Using previously reported precursor ions could not achieve high sensitivity. However, high sensitivity could be achieved by using m/z 94.9 (PSO₂⁻) generated by high collision energy as SRM monitor ion. The use of high collision energy also resulted in simplification of the pretreatment operation. Therefore, it is necessary to select a mass spectrometer that can apply high collision energy. The next thing to check was the HPLC conditions. The concentration of the ion pair reagent added to the mobile phase was examined and the best concentration of HFIP was 50 mmol/L. In addition, DIPEA was drastically reduced carryover and contributed to the enhancement of sensitivity also as the base. The success of quantitation for LNA in rat plasma administered subcutaneously at a dose of 1 mg/kg demonstrates that this method is practical. This is an innovative method that achieves high sensitivity at low cost by using high collision energy and that is without special columns or reagents. It suggested the possibility to be applied to measurement of various phosphorothioate oligonucleotide drugs in the future. (This method is patent pending.)

Conclusion

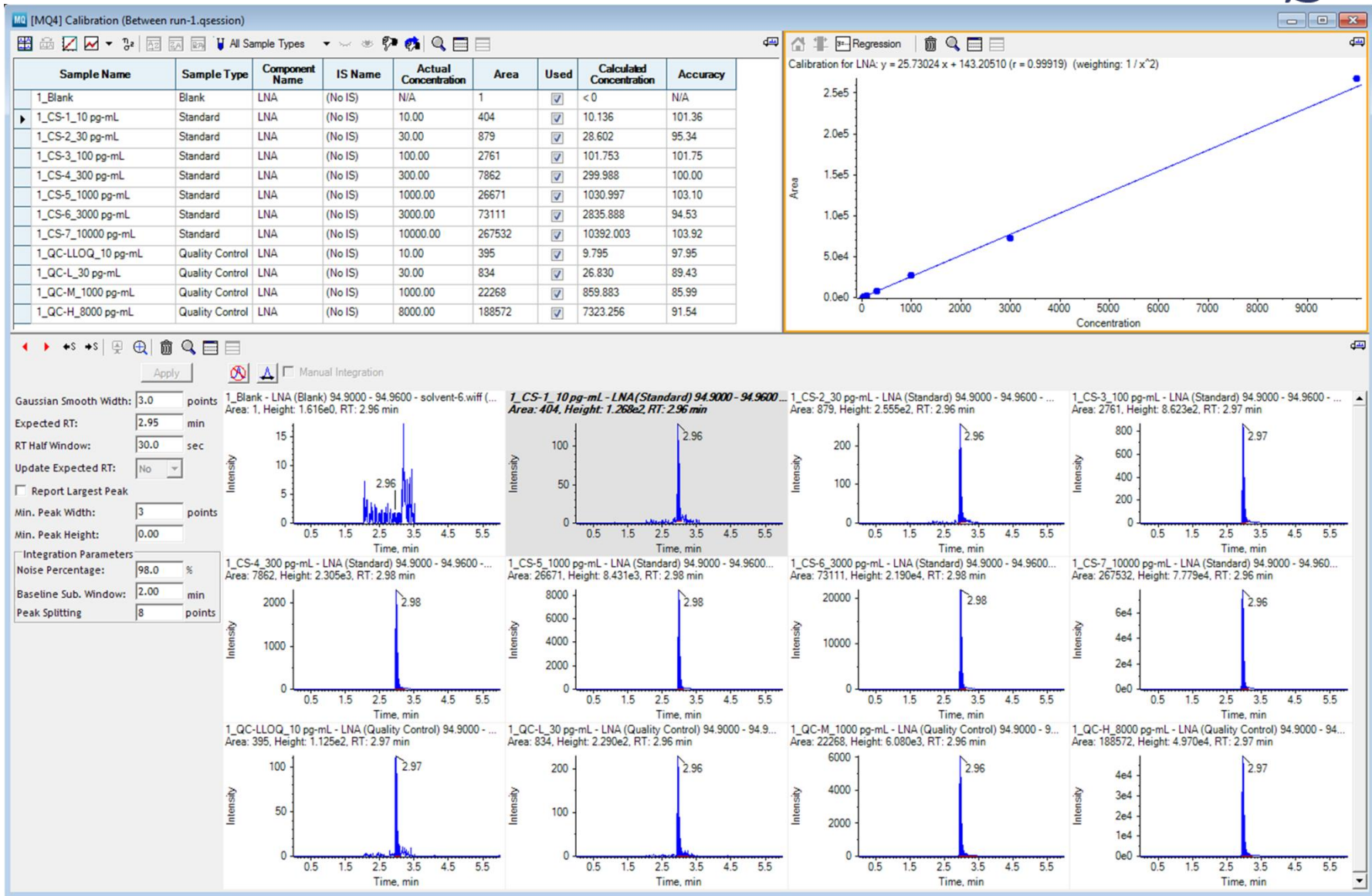
When using TripleTOF 5600+ (SCIEX)
 Lower limit of quantitation; 10.0 pg/mL, Dynamic range; 1000 fold (10.0 ng/mL as ULOQ)
 When using TripleQuad 5500 (SCIEX)
 Lower limit of quantitation; 30.0 pg/mL, Dynamic range; 1000 fold (30.0 ng/mL as ULOQ)
 Required volume of rat plasma; 100 μ L
 Same volume for both mass spectrometers

測定対象の核酸_LNA (2', 4'-BNA)



67th ASMS発表内容_検量線 (10 ~ 10,000 pg/mL of plasma,)

TripleTOF 5600plus



67th ASMS発表内容_between-run, TripleTOF 5600plus



calibration

Code	nominal conc. (pg/mL)	observed data						statistical data		
		1		2		3		mean (pg/mL)	Accuracy (RE%)	Precision (CV%)
		observed conc. (pg/mL)	Accuracy (RE%)	observed conc. (pg/mL)	Accuracy (RE%)	observed conc. (pg/mL)	Accuracy (RE%)			
CS-1	10.0	10.1	1.0	10.1	1.0	10.2	2.0	10.1	1.0	0.6
CS-2	30.0	28.6	-4.7	29.5	-1.7	28.4	-5.3	28.8	-4.0	2.0
CS-3	100	102	2.0	95.6	-4.4	100	0.0	99.2	-0.8	3.3
CS-4	300	300	0.0	280	-6.7	284	-5.3	288	-4.0	3.7
CS-5	1000	1031	3.1	1029	2.9	1019	1.9	1026	2.6	0.6
CS-6	3000	2836	-5.5	2917	-2.8	2900	-3.3	2884	-3.9	1.5
CS-7	10000	10392	3.9	11147	11.5	10977	9.8	10839	8.4	3.7
Correlation coefficient		0.99919		0.99786		0.99831				

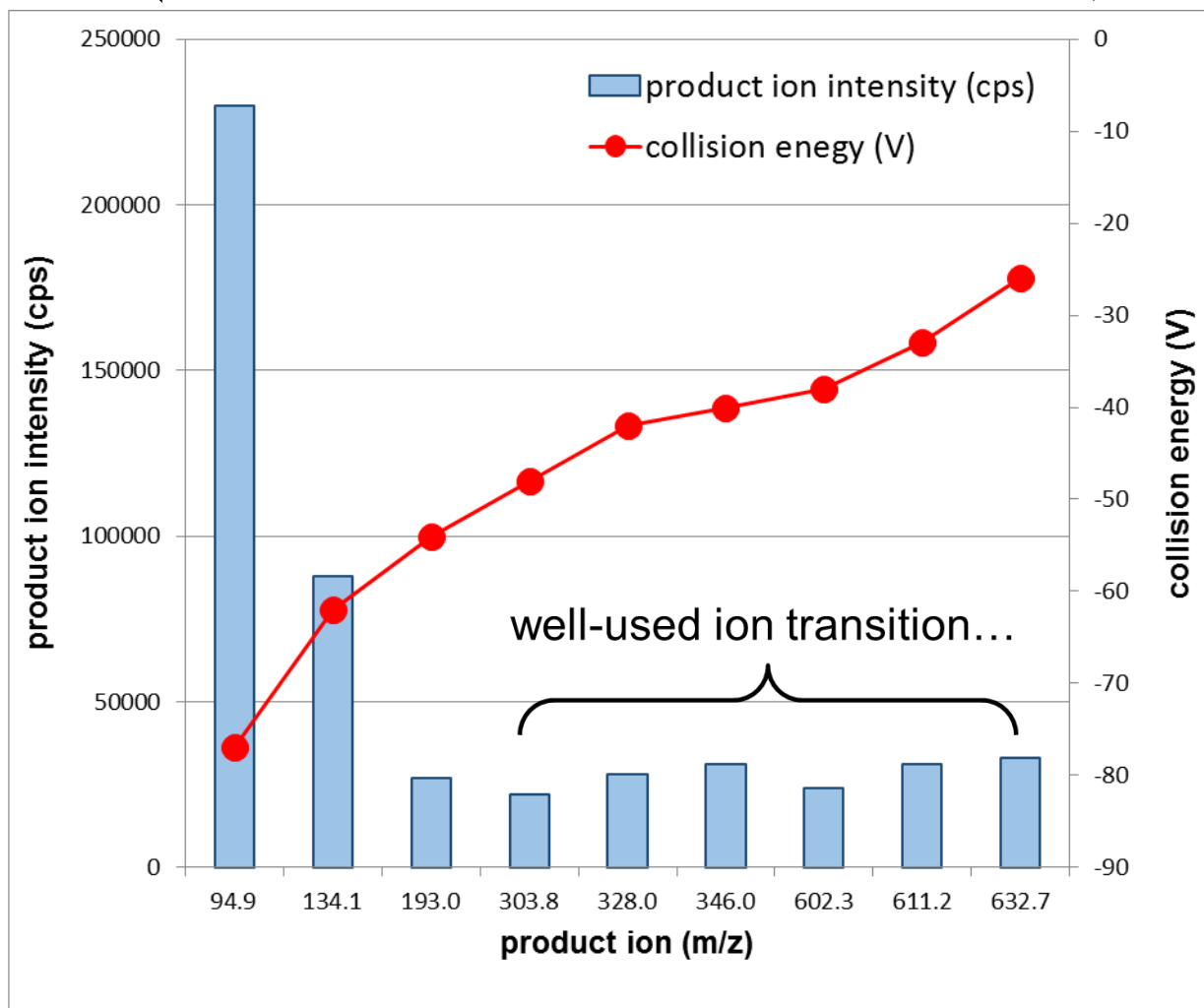
between-run

Code	nominal conc. (pg/mL)	observed data						statistical data		
		1		2		3		mean (pg/mL)	Accuracy (RE%)	Precision (CV%)
		observed conc. (pg/mL)	Accuracy (RE%)	observed conc. (pg/mL)	Accuracy (RE%)	observed conc. (pg/mL)	Accuracy (RE%)			
QC _{Low}	10.0	9.80	-2.0	10.3	3.0	10.3	3.0	10.1	1.0	2.8
QC _{Low}	30.0	26.8	-10.7	26.6	-11.3	29.5	-1.7	27.6	-8.0	5.9
QC _{Middle}	1000	860	-14.0	858	-14.2	864	-13.6	861	-13.9	0.4
QC _{High}	8000	7323	-8.5	7443	-7.0	7169	-10.4	7312	-8.6	1.9

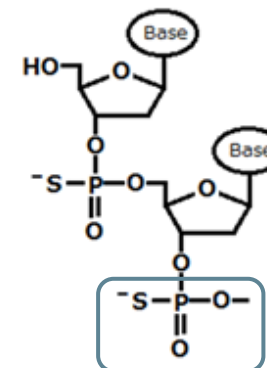
- 高感度化をもたらした因子 (67th ASMS発表内容から)
 - イオンランジションの選択
 - HPLC条件
 - 前処理
- マトリックスに応じた前処理方法
 - 血漿と臓器 (腎臓・肝臓)

プロダクトイオンの選択

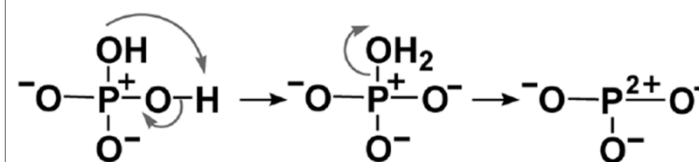
← High **Collision energy** Low →



プロダクトイオンのm/z 94.9はS化オリゴ核酸の PSO_2^- 。



Si-RNA等の測定時はリン酸エステルから生成するm/z 78.9 (PO_3^-)をプロダクトイオンとして選択。これは、m/z 97からイオン内でのプロトン転移に次ぐ脱水反応。



TripleTOF 5600⁺ analyzer tube condition

precursor ion (m/z)	product ion (m/z, start to stop)	collision energy (V)	de-clustering potential (V)
652.06	94.90 to 95.06	-77	-100

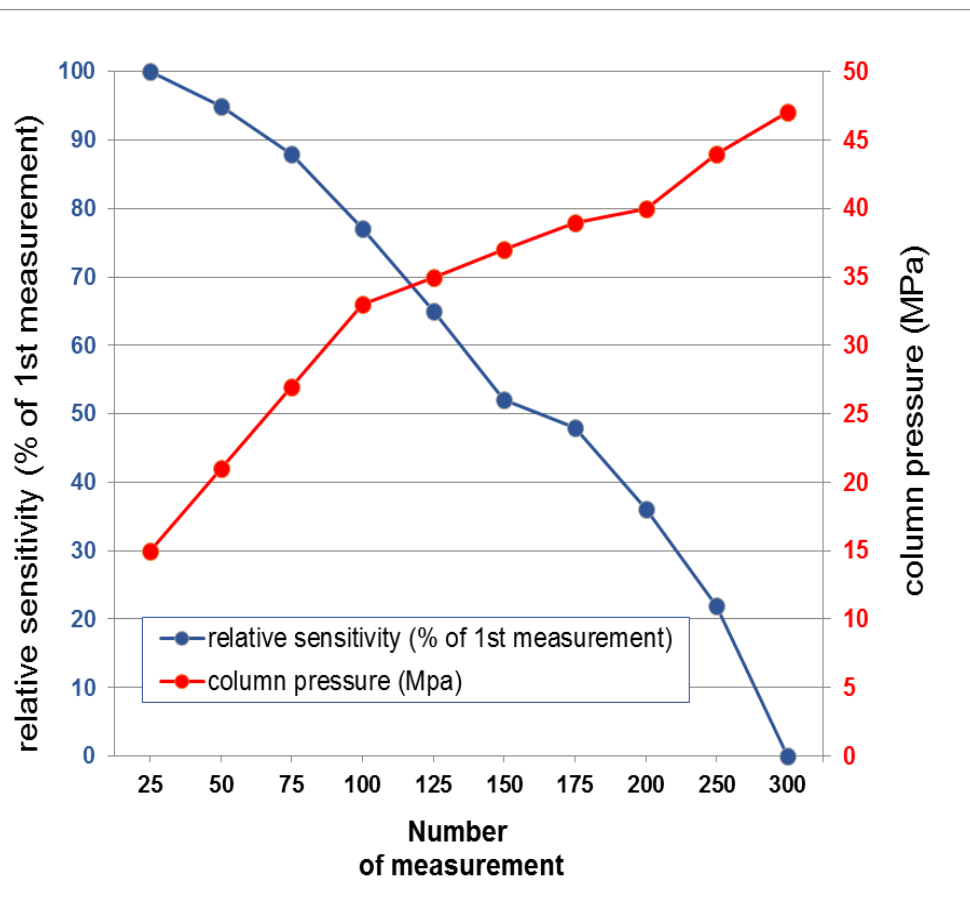
TripleQuad 5500 analyzer tube condition

precursor ion (m/z)	product ion (m/z)	collision energy (V)	de-clustering potential (V)	collison gas (valve No.)
652.1	94.9	-103	-109	11

アンチセンス核酸薬の定量には、
高いコリジョンエネルギーを印加できる質量分析計が有利

- 高感度化をもたらした因子 (67th ASMS発表内容から)
 - イオンランジションの選択
 - **HPLC条件**
 - 前処理
- マトリックスに応じた前処理方法
 - 血漿と臓器 (腎臓・肝臓)

★ HPLCカラムに耐久性がない。



カラム圧力の上昇に伴い、感度の著しい低下が発生する。

★ 移動相は用時に調製

Waters社製

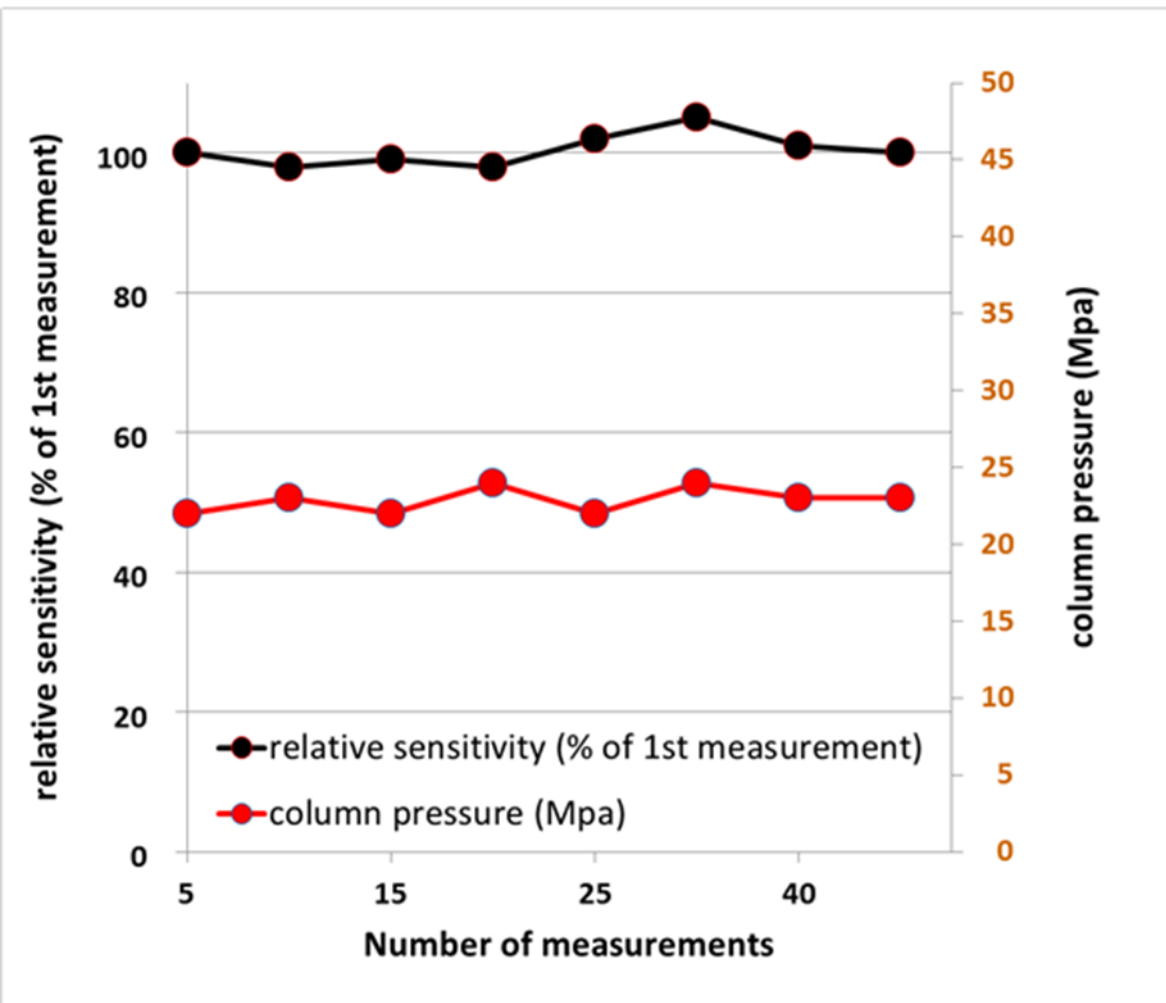
- ・ ACQUITY UPLC Oligonucleotide BEH C18 (左グラフ)
- ・ Xbridge Peptide BEH C18
- ・ Xbridge BEH C18

GLサイエンス社製

- ・ InertSustain Bio C18

Imtakt社製

- ・ Cadenza CD-C18



圧力変動の少ない、感度が安定したカラムを選択。

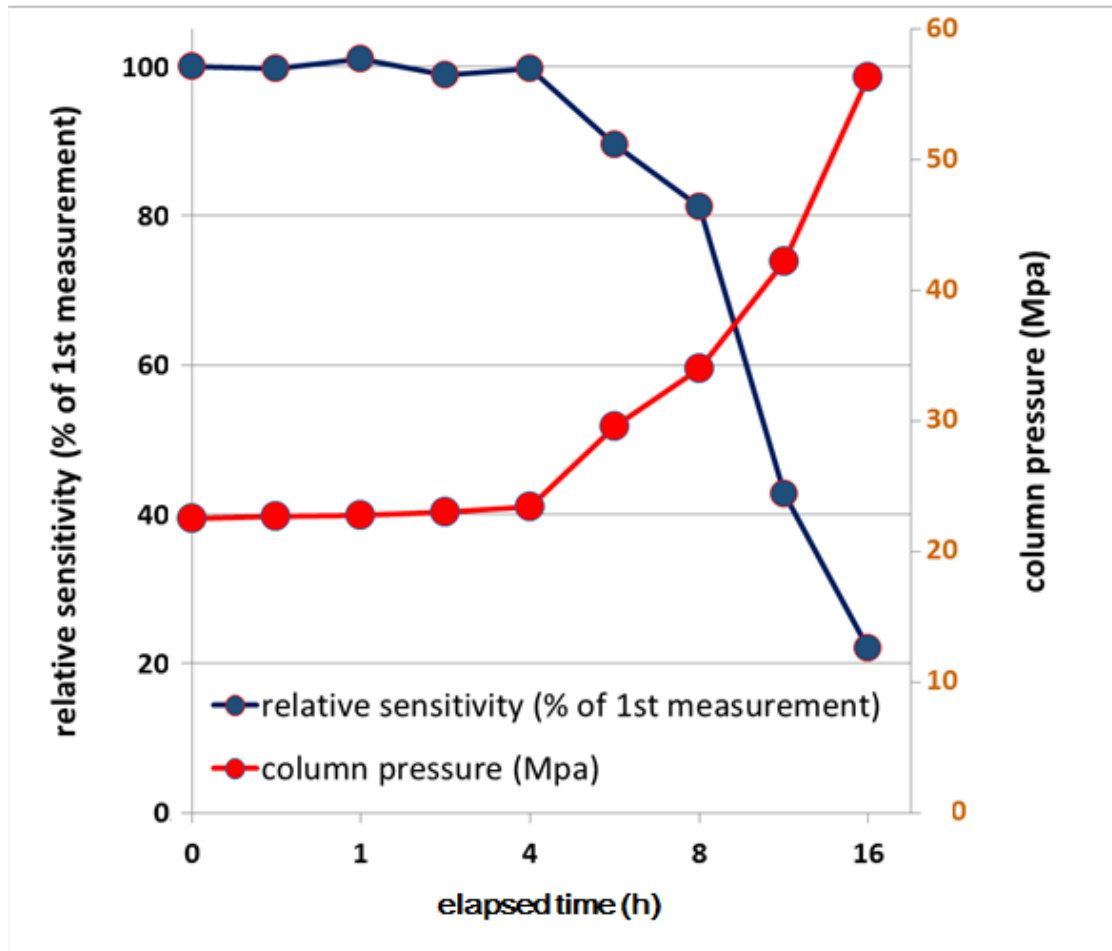
★ 移動相は用事に調製

ThermoSCIENTIFIC社製
・ DNAPac™ RP (左グラフ)

他選択肢としては
GLサイエンス社製

・ AQ-C18
★ 但し感度はDNAPac™RPの85%

DNAPac™ RPの欠点
・ 高価格 (定価 96,000円/本)
・ 長納期 (オーダー後、納期は約1か月)



長時間測定には耐えられない。

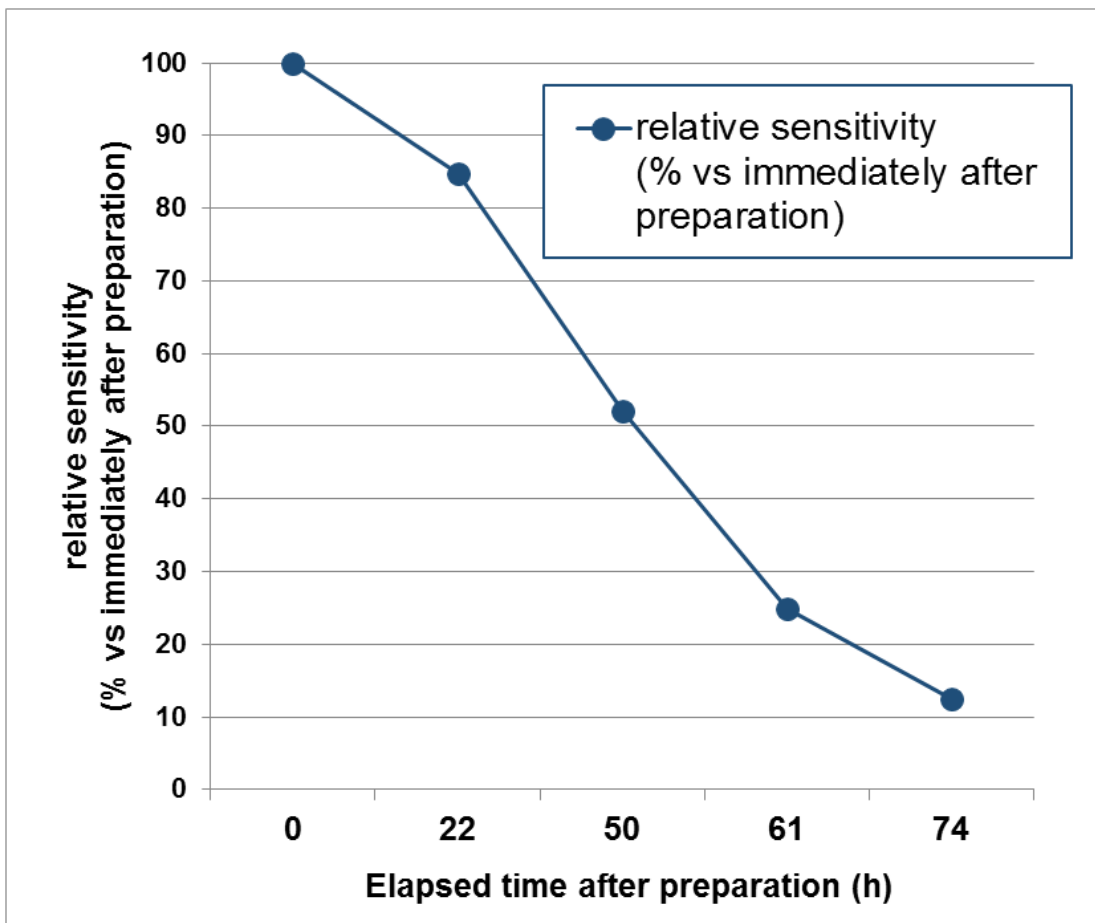
★ 移動相は用時に調製

ThermoSCIENTIFIC社製
・ DNAPac™ RP (左グラフ)



移動相に含まれるイオンペア剤 (HFIP*)とボトル素材のガラスが反応？

*; 1,1,1,3,3,3-Hexafluoro-2-propanol



移動相ボトルをガラス以外の素材に変更

★ 半導体で使用するフッ化水素の容器が候補

PTFE素材のボトル



★ 結果、感度低下。(左図)

HFIPの物理・化学的性質を再考する必要。

特性	
化学式	$C_3H_2F_6O$
モル質量	$168.04 \text{ g mol}^{-1}$
外観	無色透明液体
匂い	刺激臭
密度	1.596 g/mL
融点	$-3.3 \text{ }^\circ\text{C}$, 270 K , $26 \text{ }^\circ\text{F}$
沸点	$58.2 \text{ }^\circ\text{C}$, 331 K , $137 \text{ }^\circ\text{F}$
水への溶解度	混和
蒸気圧	$16 \text{ kPa at } 20 \text{ }^\circ\text{C}$
粘度	$1.65 \text{ cP at } 20 \text{ }^\circ\text{C}$

Wikipediaから引用

1,1,1,3,3,3-ヘキサフルオロ-2-プロパノール
蒸気による種々の金属酸化物表面の処理
日本化学会誌(化学と工業化学)
/1987 巻 (1987) 1 号

ヘキサフルオロイソプロパノール基を含む
ノボラック樹脂およびその製造方法、並び
にその組成物
半導体材料特許(W O 2014/104126 A 1)



いずれも蒸散させて半導体表面
の加工に使用
★ HFIPの蒸散が原因??

問題点__ HFIPの蒸散が原因？

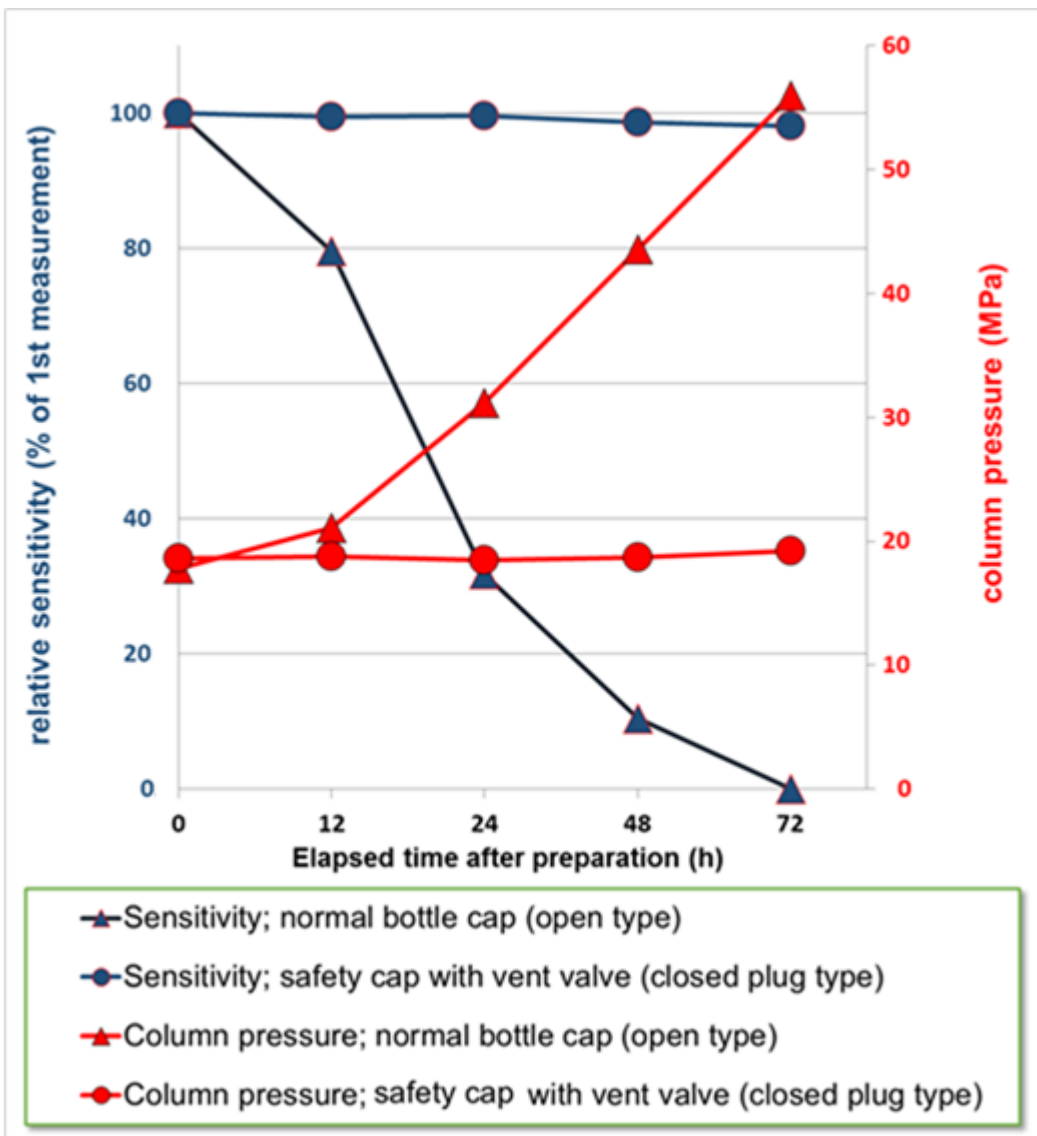


HFIPの入ったボトル口にアルミ箔を巻くと、黒く変色する。

- ★ HFIPの水溶液を調製しても、HFIPは水と混和するだけ(混合液)。
→ メタノールやアセトニトリル、他イオンペア剤とは異なる性質。

HFIP混合液のボトル口を密栓し、水面より上にHFIPの蒸気層を作って混合液からの蒸散を少なくする。





簡便な方法でHFIPの蒸散を少しでも抑えると、安定な測定の実現が可能になる。

(特願 2019-102988号、5月31日)

但しHFIP混合液中の濃度は

50 mmol/L

→ アンチセンス核酸薬では、50 mmol/Lで最大感度を観察。

★ HFIPを高濃度にすると、経時的に感度の低下とカラム圧の上昇が始まる。

- ヒューニツヒ塩基

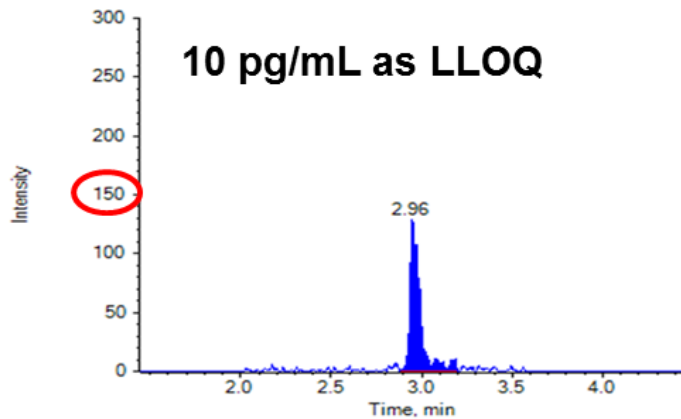
求核反応(N-アルキル化)を抑えた塩基。トリエチルアミンを塩基として使いやすくしたものがN,N-ジイソプロピルエチルアミン(DIPEA)。

- キャリーオーバー

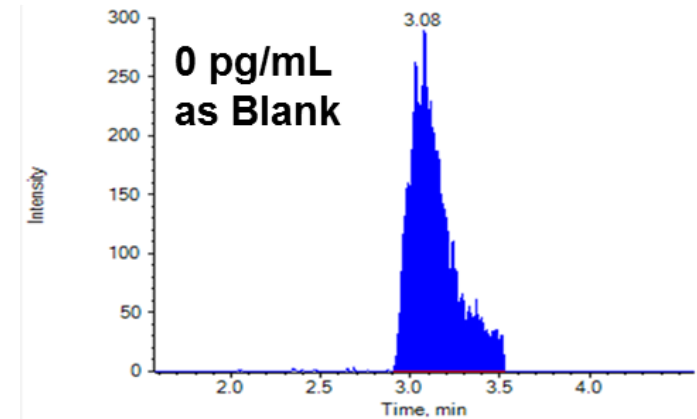
測定対象物がLC-MS/MS内に貯留する現象。HPLCインジェクター、バルブシール、配管、HPLCカラムのプレフィルター、カラム充填剤、カラム内壁への吸着が主たる原因。

キャリアオーバーの低減__ヒューニツヒ塩基への変更

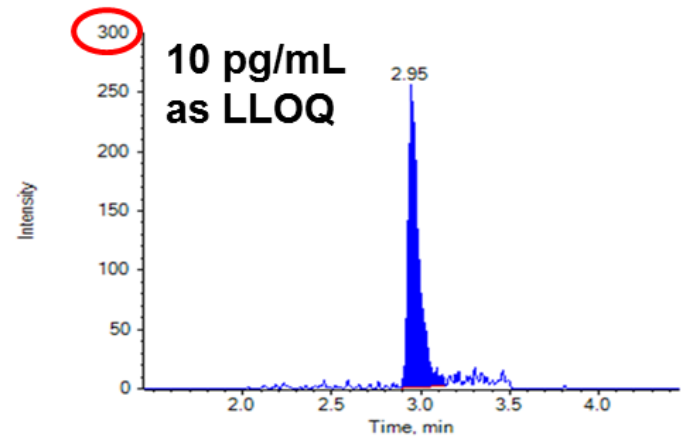
Mobile phase; 50 mmol/L HFIP + 10 mmol/L TEA



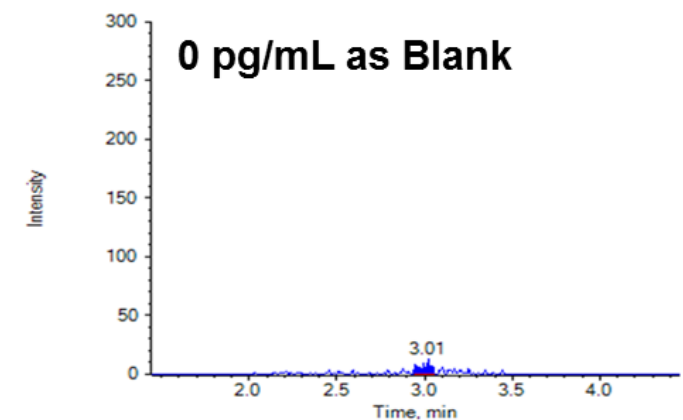
10000 pg/mL as ULOQ



Mobile phase; 50 mmol/L HFIP + 10 mmol/L DIPEA



10000 pg/mL as ULOQ



HPLC condition

column	Cadenza CD-C18, 3 μ m, 50x3mm, Imtakt (InertsustainBioC18 (peek), 3 μ m, 100x3mm ,GL science)
column oven temp.	60°C
mobile phase	A; 50 mmol/L HFIP+10 mmol/L DIPEA in aqueous B; acetonitrile
injection volume	5 ~ 20 μ L
washable solvent	weak; 50v/v% acetonitrile strong; 2-propanol

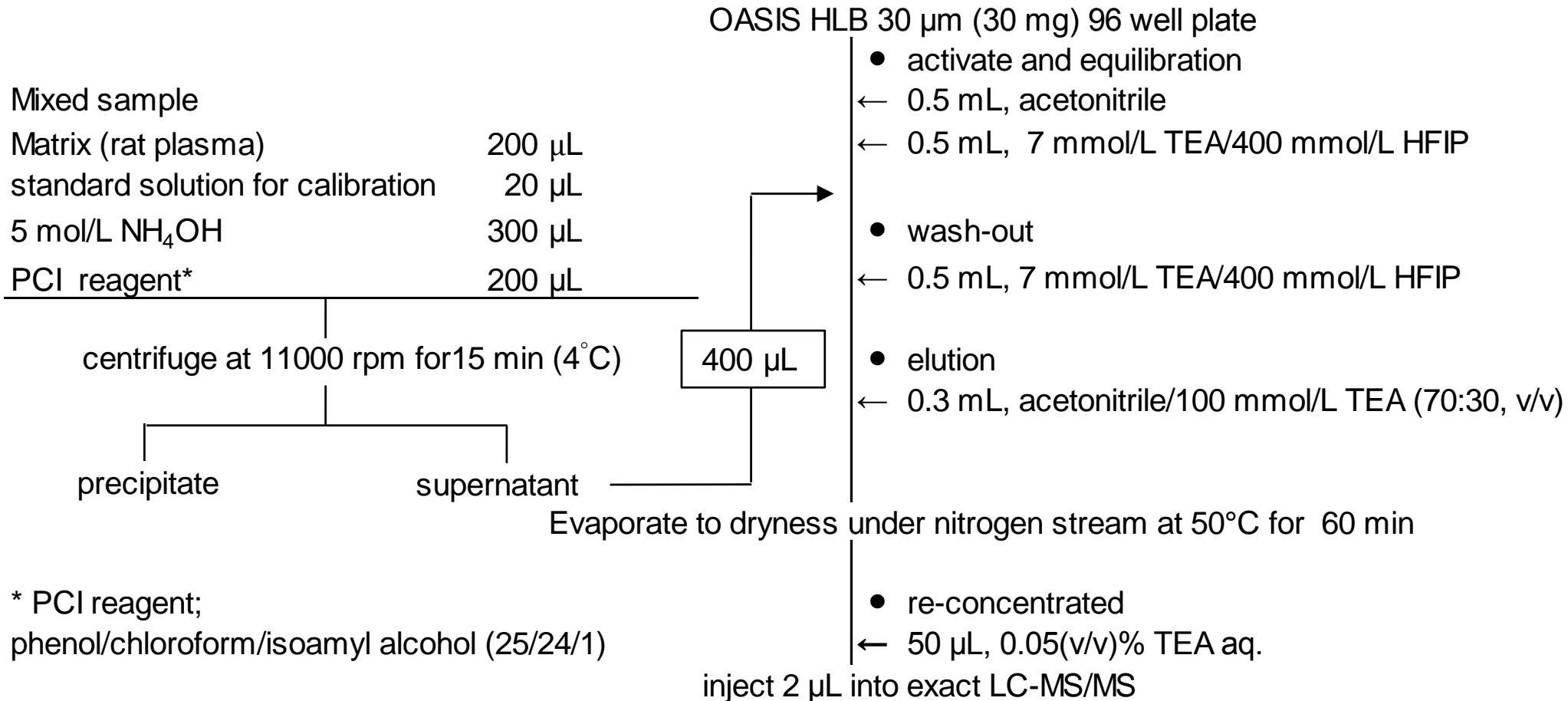
TripleTOF 5600⁺ analyzer tube condition

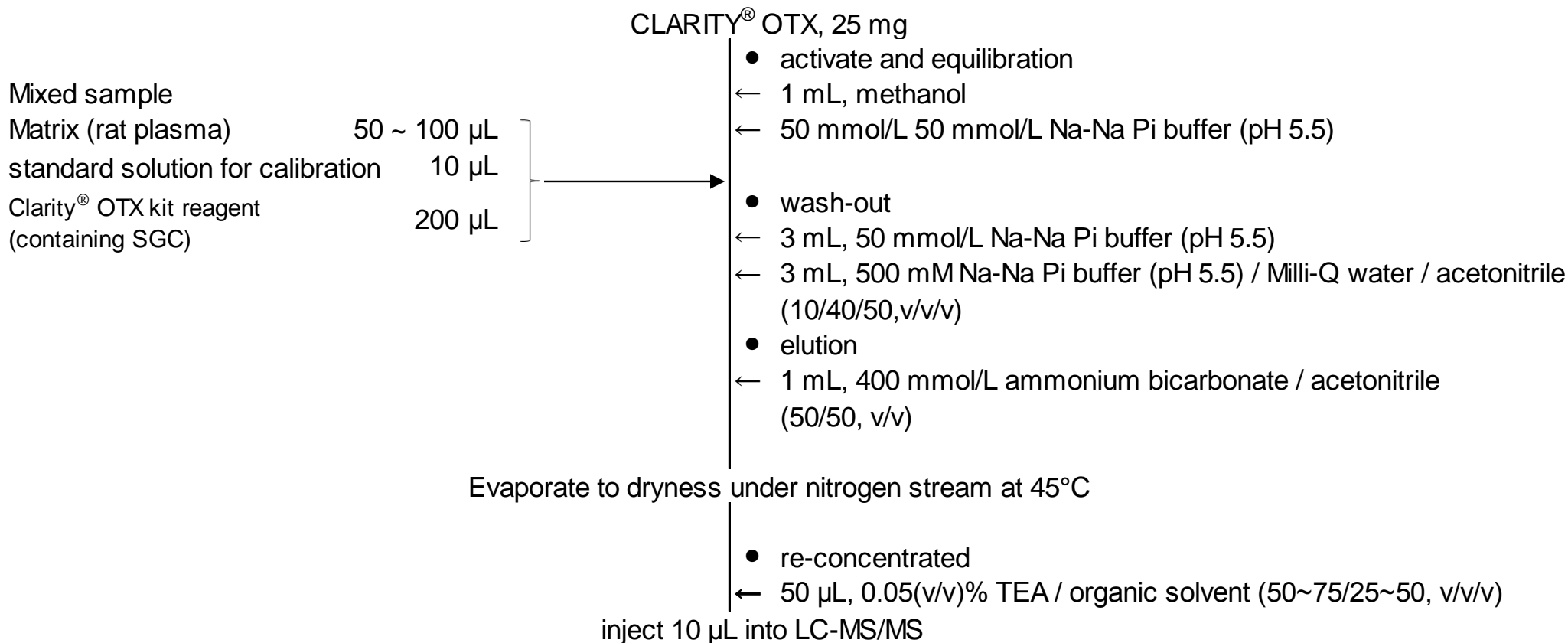
precursor ion (m/z)	product ion (m/z, start to stop)	collision energy (V)	de-clustering potential (V)
652.06	94.90 to 95.06	-77	-100

TripleQuad 5500 analyzer tube condition

precursor ion (m/z)	product ion (m/z)	collision energy (V)	de-clustering potential (V)	collison gas (valve No.)
652.1	94.9	-103	-109	11

- 高感度化をもたらした因子 (67th ASMS発表内容から)
 - イオンランジションの選択
 - HPLC条件
 - **前処理**
- マトリックスに応じた前処理方法
 - 血漿と臓器 (腎臓・肝臓)





Provider; Tong Ly, Ph. D.
HPLC, GC and SPE technical consultant
Phenomenex

前処理方法_SNBL method

OASIS HLB 30 μm (30 mg) 96 well plate

Mixed sample

Matrix (plasma, Anticoagulant; EDTA-2Na)	10 ~ 100 μL
1 mol/L TEAA (pH 8.4)	100 μL

apply

activate and equilibration

- ← 1 mL, acetonitrile
- ← 1 mL, 1 mol/L TEAA (pH 8.4)

wash-out

- ← 2 mL, Milli-Q water

elution

- ← 0.3 mL, 50% acetonitrile aqueous solution

Evaporate to dryness under nitrogen stream at 50°C

re-concentrated

- ← 50 μL , 0.05(v/v)% TEA aq.

inject 2 to 10 μL into exact LC-MS/MS

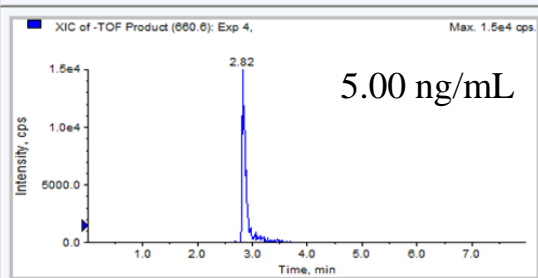
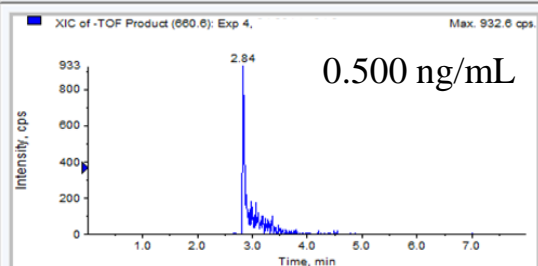
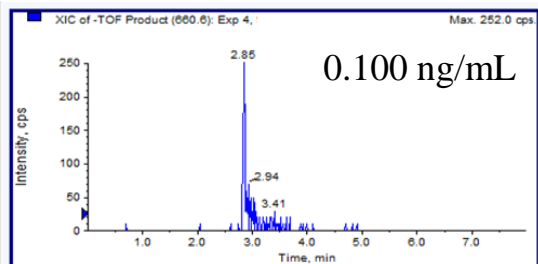
3法のラット血漿中LNA抽出結果の比較

Comparison item	A company seminar (OASIS HLB)		Phenomenex (Clarity® OTX)				SNBL (OASIS HLB)			
	200		50		100		10		100	
Plasma volume (μ L)	200		50		100		10		100	
QCs ID	nominal conc. (ng/mL)	recovery (%)	nominal conc. (ng/mL)	recovery (%)	nominal conc. (ng/mL)	recovery (%)	nominal conc. (ng/mL)	recovery (%)	nominal conc. (ng/mL)	recovery (%)
LLOQ	2.00	51.8	0.100	86.6	0.25	77.8	0.03	81.1	0.01	82.8
QC low	6.00	49.0	0.300	84.8	0.75	78.9	0.09	82.6	0.03	83.6
QC middle	200	45.6	10.0	87.2	25.0	79.5	3.00	84.8	1.00	85.1
QC high	1800	40.8	90.0	88.9	225	80.2	27.0	86.7	9.00	87.2

他修飾基3種の血漿中LNA抽出方法

誘導体化	LNA	2'-MOE	AmNA	ENA
固相抽出プレート	OASIS HLB 96 well plate, 30 mg (30 μ m particle size)			
ローディング溶媒	1 mol/L TEAA (pH 8.4)			
洗浄溶媒	Milli-Q water			
溶出溶媒	50(v/v)% acetonitrile aq.			

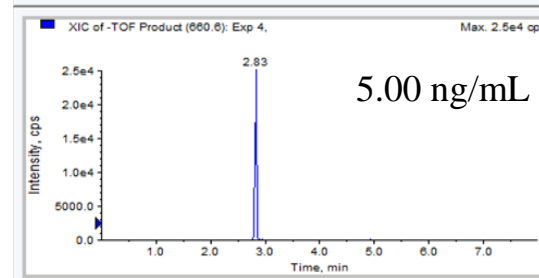
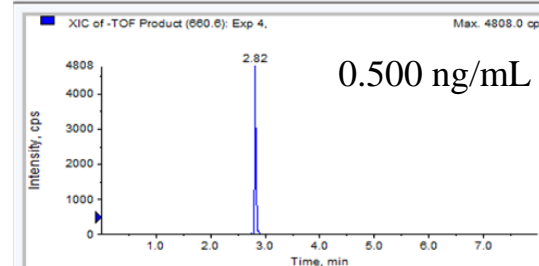
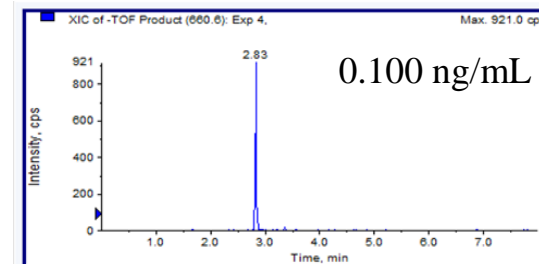
ENA修飾核酸での感度比較



Clarity® OTX

血漿 10 μ L、ENA修飾核酸濃度
0.100, 0.500, 5.00 ng/mL of plasma
のサンプルを用い、exact MS
(TripleQuad 6600plus)で感度比較。

OASIS HLBはClarity® OTXの
約3倍、高感度化が望める。
→ 血漿量が少なくなると、Clarity® OTX
の塩化グアニジウムによるタンパク
質可溶化が測定に影響を与えてい
る？



OASIS HLB (SNBL)

- 高感度化をもたらした因子 (67th ASMS発表内容から)
 - イオンランジションの選択
 - HPLC条件
 - 前処理
- マトリックスに応じた前処理方法
 - 血漿と臓器 (腎臓・肝臓)

問題点；感度が安定しない。

【マトリックス；肝臓、腎臓の20% homogenate (PBS)】

★ 核酸医薬品がタンパク質に強固な結合・・・感覚的には接着に近い。

- ① 有機溶媒ブレイクは回収できない。
- ② アルカリ加水分解は低～中濃度 (10 ~ 100 pg/mL of 20% homogenate) で不安定な挙動を示す。
- ③ 生物化学用界面活性剤 (CHAPSO等) で10%程度の回収。
- ④ Triton X-100 (0.5%)、Nonidet P-40 (1%) で、25~67%の回収。

⇒ タンパク質を分解(消化)する前処理方法

タンパク質の消化

- 変性・還元を併用する制限酵素 (Trypsin/Lys. C. 等) を使った一般的な消化
- 可溶化・還元を併用するProteinase K*を使った非特異的な消化

*; セリンプロテアーゼで非常に広い切断特異性

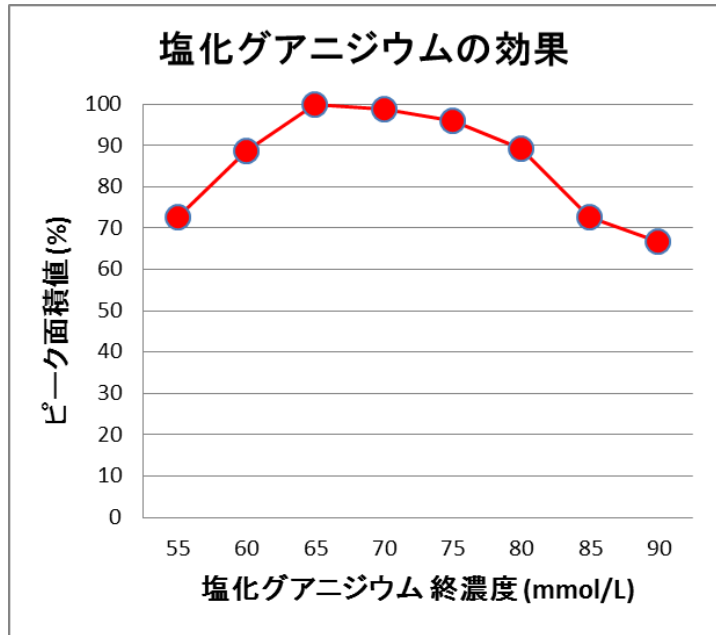
★ 酵素消化におけるメジウム添加剤の検討

代表的なメジウム添加物質

消化前メジウム	試薬名
可溶化	塩化グアニジウム
	Triton X-100
コファクター捕捉	EDTA
還元	DTT

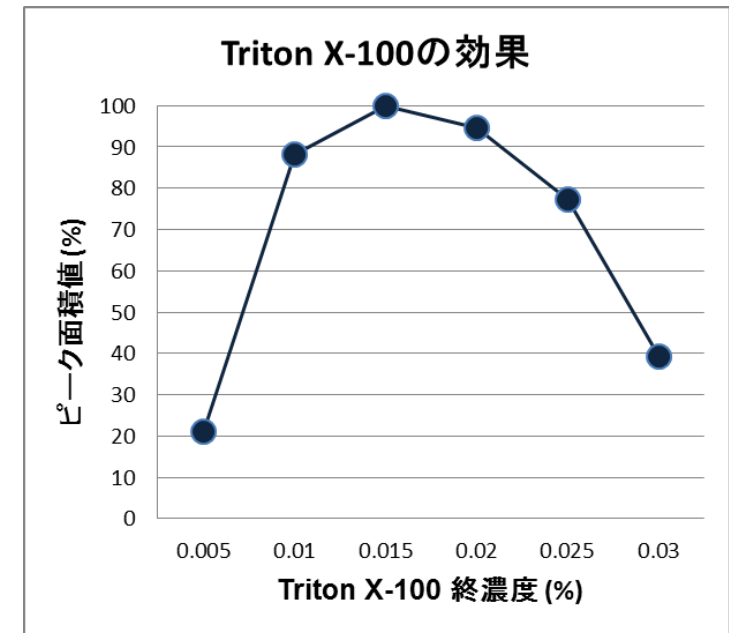
- 文献によって様々なメジウムが紹介されているため、LC-MS/MS測定における最適なメジウムを検討する必要があると判断。
- SPEはClarity OTXを使用するため、消化後はPhenomenex推奨の添加剤濃度を使用。

臓器中濃度測定法_タンパク質の分解（消化）における可溶化剤 と界面活性剤の影響



共存するTriton X-100を0.2%に固定した場合、
消化前に添加する塩化グアニジウム終濃度は、
65~70 mmol/Lの範囲が適正と思われる。

共存する塩化グアニジウムを終濃度 67.5%に
固定した場合、消化前に添加するTriton X-100
終濃度は0.01~0.02%程度が適正と思われる。

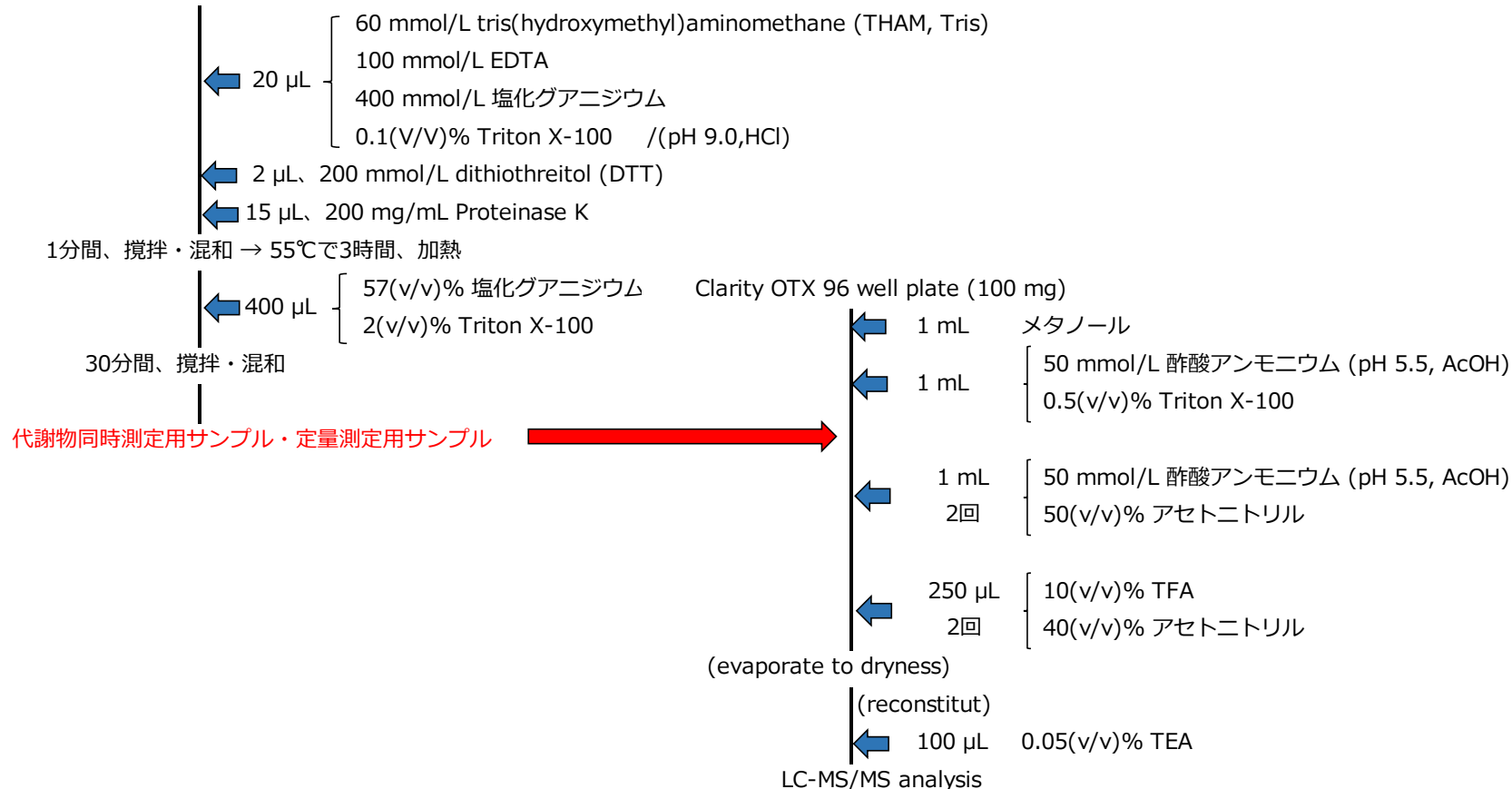


臓器中濃度測定法_タンパク質の分解と固相抽出

20(w/v)% ホモジネートの調製

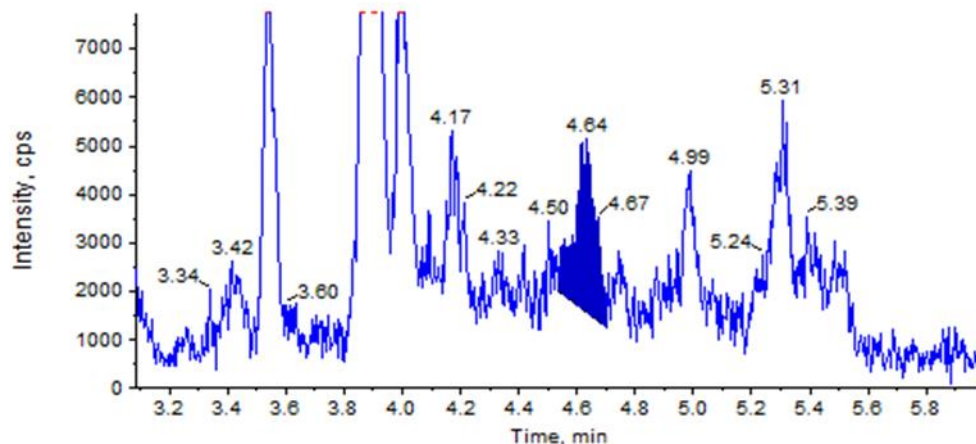
肝臓・腎臓 + 代謝物測定..... [100 mmol/L tris(hydroxymethyl)aminomethane (THAM, Tris)
 1 mmol/L 酢酸マグネシウム / (pH 8.0, HCl)
 濃度測定..... リン酸緩衝液、Tris buffer etc.
 ・ ダウンスホモジナイザーで懸濁後、ポリトロンホモジナイザーで破碎

20(w/v)% 臓器ホモジネート; 100 μ L



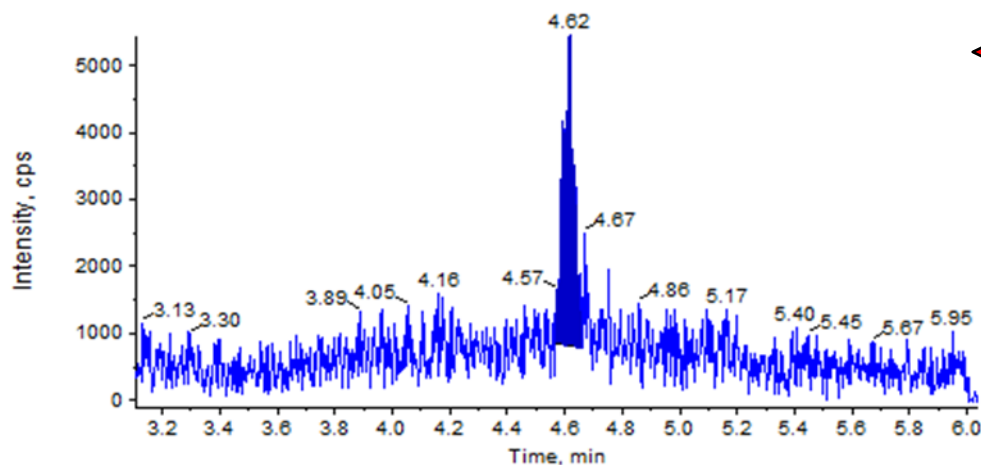
効果_ラット血漿からのLNA抽出

Extract-1_30 pg/mL (100 uLplasma_Final 50 uL)-1 - LNA (Standard) 652.100/94.900 D...
Area: 15058 counts Height: 3.62e+003 cps RT: 4.64 min



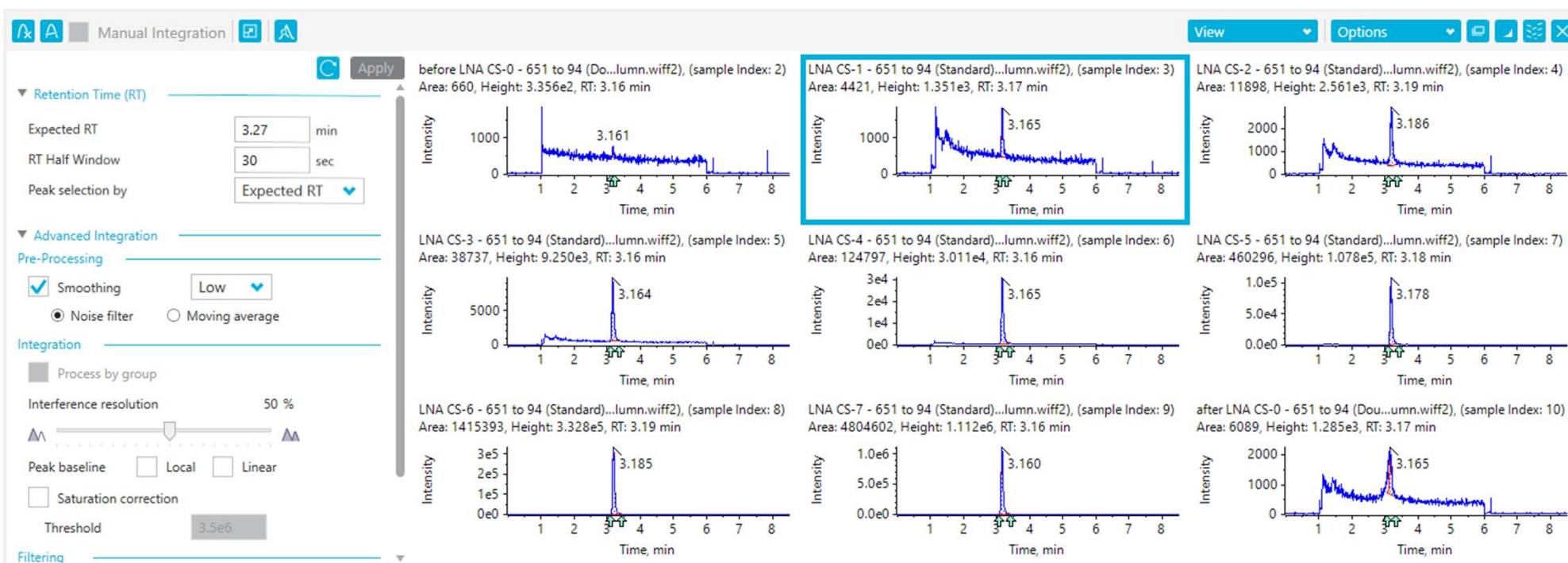
◀ 67th ASMS発表時のラット血漿から抽出したLNA MSクロマトグラム
LLOQとして30 pg/mL、血漿量100 μL
TripleQuad 5500にて測定。

1_30 pg/mL (100 uLplasma_Final 50 uL)-1 - LNA (Standard) 652.100/94.900 Da - sam...
Area: 10369 counts Height: 4.64e+003 cps RT: 4.62 min



◀ Proteinase Kによる処理を加え、ラット血漿から抽出したLNA MSクロマトグラム
LLOQとして30 pg/mL、血漿量100 μL
TripleQuad 5500にて測定。
抽出は67th ASMSと同様、OASIS HLBによる固相抽出

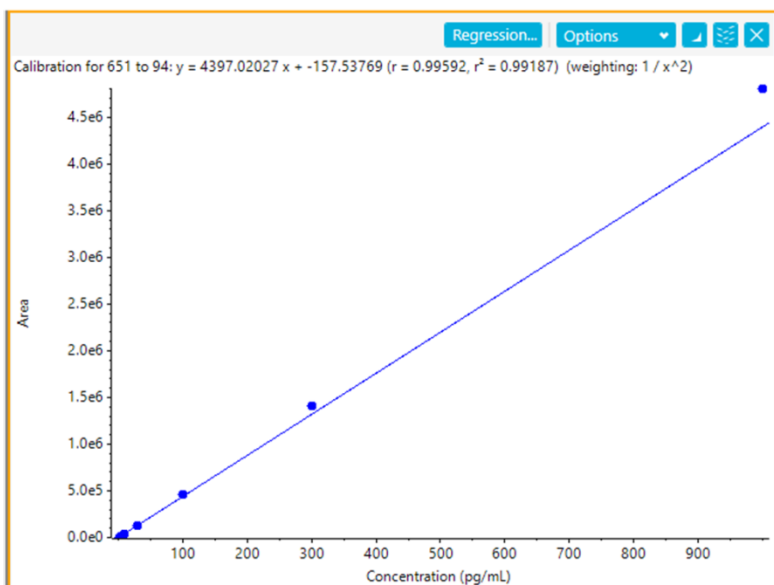
効果_ラット肝臓20% ホモジネートからのLNA抽出



- ▲ 20%ラット肝臓ホモジネート(100 μ L)をProteinase Kで消化後、OASIS HLBで抽出したLNA MSクロマトグラム
- 濃度範囲は0、1.00、3.00、10.0、30.0、100、300、1000 pg/mL of 20% rat liver homogenate。
- 7500 QTRAP(E-lens無)で測定。
- ★ 要 キャリーオーバー対策

効果_ラット肝臓20% ホモジネートから抽出したLNA検量線

Sample Name	Sample Type	Component Name	Component Type	Component Group Name	Actual Concentration	Area	Used	Calculated Concentration	Accuracy
before LNA CS-0	Double Blank	651 to 94	Quantifiers	LNA	N/A	660	<input type="checkbox"/>	0.186	N/A
LNA CS-1	Standard	651 to 94	Quantifiers	LNA	1.00	4421	<input checked="" type="checkbox"/>	1.041	104.12
LNA CS-2	Standard	651 to 94	Quantifiers	LNA	3.00	11898	<input checked="" type="checkbox"/>	2.742	91.39
LNA CS-3	Standard	651 to 94	Quantifiers	LNA	10.00	38737	<input checked="" type="checkbox"/>	8.846	88.46
LNA CS-4	Standard	651 to 94	Quantifiers	LNA	30.00	124797	<input checked="" type="checkbox"/>	28.418	94.73
LNA CS-5	Standard	651 to 94	Quantifiers	LNA	100.00	460296	<input checked="" type="checkbox"/>	104.720	104.72
LNA CS-6	Standard	651 to 94	Quantifiers	LNA	300.00	1415393	<input checked="" type="checkbox"/>	321.934	107.31
LNA CS-7	Standard	651 to 94	Quantifiers	LNA	1000.00	4804602	<input checked="" type="checkbox"/>	1092.731	109.27
after LNA CS-0	Double Blank	651 to 94	Quantifiers	LNA	N/A	6089	<input type="checkbox"/>	1.421	N/A



20%ラット肝臓ホモジネート(100 μ L)をProteinase Kで消化後、OASIS HLBで抽出したLNA MSクロマトグラム計算結果と検量線

濃度範囲は0、1.00、3.00、10.0、30.0、100、300、1000 pg/mL of 20% rat liver homogenate。

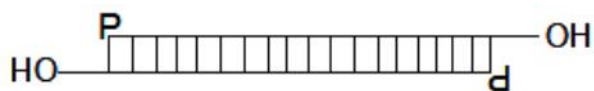
7500 QTRAP (E-lens無)で測定。

★ 要 キャリーオーバー対策

効果_ラット肝臓20% ホモジネートからのsi-RNA抽出

1 ng/mL of 20% rat liver homogenateを調製後、2種類の方法でsi-RNAを抽出した。

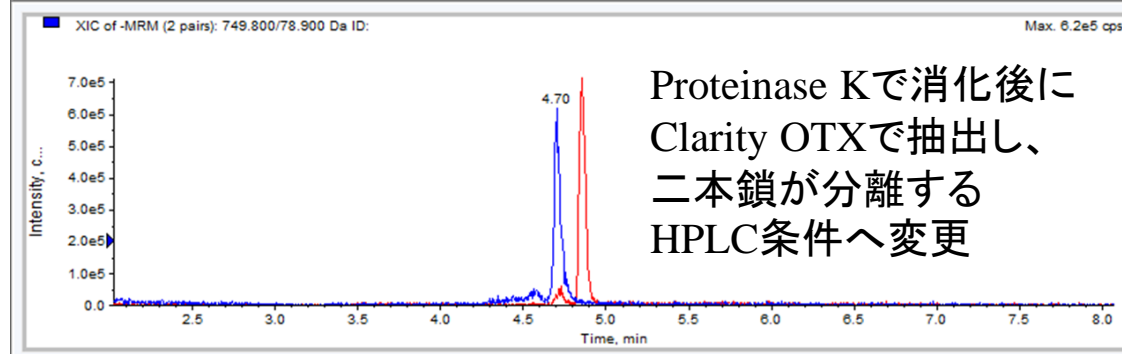
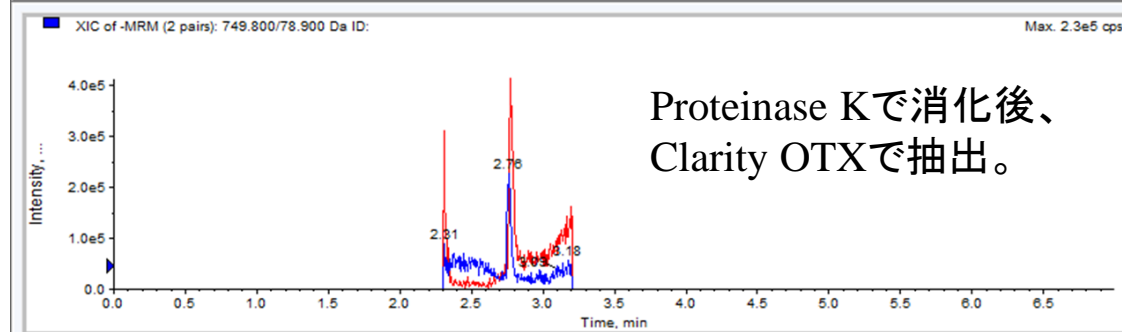
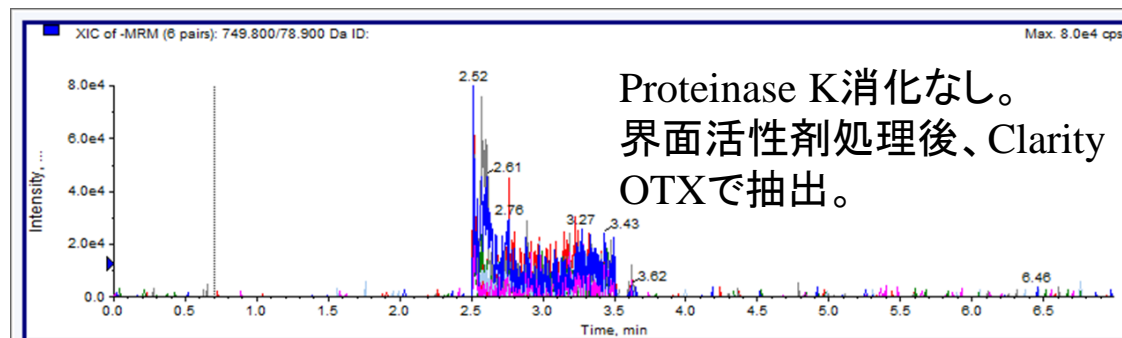
測定条件はsi-RNAの基本構造を基に、



Schematic representation of a siRNA molecule: a ~19-21basepair RNA core duplex that is followed by a 2 nucleotide 3' overhang on each strand. OH: 3' hydroxyl; P: 5' phosphate.

Wikipediaから引用

各々の鎖毎にプリカーサーイオンを設定。プロダクトイオンはリン酸エステルから生成するm/z 78.9 (PO_3^-)を選択。



▲ 抽出条件によるsi-RNAのMSクロマトグラム

MS条件;

- プロダクトイオン 修飾型アンチセンス核酸.....m/z 94.9 (PSO₂⁻)
 si-RNA.....m/z 78.9 (PO₃⁻)

HPLC条件;

- HPLCカラム.....CADENZA CD-C18 3 μm, 2.1 × 50 mm
 - カラム温度.....50~60℃
 - 移動相A.....50 mmol/L HFIP, 10 mmol/L DIPEA
 - 移動相B.....アセトニトリル
 - 流速.....0.3 mL/min
 - 洗浄溶媒.....50(v/v)% アセトニトリル水溶液*
- * 高感度化に伴い、検討が必要
- グラジエント条件...0~1min (B-0%) → 5 min (B-20~40%)

高感度測定条件_まとめ ; 基本的な前処理方法

25~100 μL ; 20% 肝臓・腎臓ホモジネート、高感度化が必要な血漿サンプル

