

# 采用 nSMOL 试剂盒建立人血浆中贝伐珠单抗定量分析方法的重现性验证

LCMSMS-246

**摘要：**本实验采用 nSMOL 试剂盒对人血浆中贝伐珠单抗进行样品前处理，建立贝伐珠单抗的定量检测方法，获得 0.146-300  $\mu\text{g/mL}$  的线性范围，线性关系良好，并验证得出 nSMOL 试剂盒样品前处理与分析方法在不同人员间转移所得结果具有良好的重现性。实验结果表明 nSMOL 试剂盒在单克隆抗体类药物检测中，可简化处理步骤、缩短样品处理时间，并提供标准化处理方法，获得单抗类药物特征性肽段，提高检测方法的特异性与灵敏度，具有适用性广、实用性强等优势，为应用 LC-MS/MS 技术检测与研发单抗类药物提供可靠工具。

**关键词：**nSMOL 试剂盒 三重四极杆质谱 贝伐珠单抗 生物定量分析

贝伐珠单抗，商品名“阿瓦斯汀”，是一种阻碍血管生成的药物，属于人源化抗-VEGF 单克隆抗体，可通过与血管内皮生长因子 (VEGF-A) 特异性结合，阻止其与受体相互作用，发挥对肿瘤血管的多种作用，如使现有的肿瘤血管退化，从而切断肿瘤细胞生长所需氧气及其他营养物质等，可提高化疗药物的效果，常用于治疗转移性结直肠癌、肺癌、宫颈癌等。临床研究表明，贝伐珠单抗药代动力学参数具有体内清除率较低、典型中央室体积较窄、半衰期时间长等特点，因此可靠的血浆中贝伐珠单抗浓度检测方法对治疗效果、用药安全性评价与指导临床用药剂量，均具有重要作用。

目前，对生物样本中单抗浓度检测使用较多的为酶联免疫吸附剂测定 (enzyme linked immunosorbent

assay, ELISA) 法，但该方法具有无法区分内源变化产生的抗体类似物与外源性单抗药物等不足。在生物大分子分析检测领域中，样品前处理专业技术与蛋白质特征性肽段定量方法较为缺乏。为此，岛津公司自主研发的 nSMOL 试剂盒，通过纳米表面限制性和导向性酶解抗体药物实现 Fab 区域的选择性酶解，建立液质联用法对人血浆中贝伐珠单抗进行定量分析，简化并缩短样品前处理时间，提高单抗药物检测的特异性与灵敏度。此外，此类通用分析方法经验证之后，可实现分析方法在不同地点、不同人员间的转移，确保结果具有出色的重现性。本实验则采用 nSMOL 试剂盒进行人血浆样本前处理，建立液质联用方法，进行不同人员间所得结果的重现性验证分析。

## 实验部分

### 1.1 仪器

本实验使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 与三重四极杆质谱仪 LCMS-8060 联用系统。具体配置为 LC-30AD $\times$ 2 输液泵，DGU-20A5R 在线脱气机，SIL-30ACMP 自动进样器，CTO-20AC 柱温箱，CBM-20A 系统控制器，LCMS-8060 三重四极杆质谱仪，LabSolutions Ver. 5.80 色谱工作站。

### 1.2 分析条件

#### 液相条件

色谱柱：Shim-pack GISS C18(2.1 mm I.D.  
 $\times$ 50 mmL, 1.9  $\mu\text{m}$ )

流动相：A 相 -0.1% 甲酸水溶液  
B 相 -0.1% 甲酸乙腈

流速：0.4 mL/min

柱温：50 $^{\circ}\text{C}$

进样量：5  $\mu\text{L}$

自动进样器温度：15 $^{\circ}\text{C}$

洗脱方式：梯度洗脱，B 相初始浓度为 1%，  
洗脱程序见表 1。

#### 质谱条件

分析仪器：LCMS-8060

离子源：ESI(+)

离子源接口电压：0.5 kV

雾化器流速：3 L/min

加热气流速：10 L/min

接口温度：300 $^{\circ}\text{C}$

DL 温度：250 $^{\circ}\text{C}$

加热模块温度：450 $^{\circ}\text{C}$

干燥气流速：10 L/min

扫描模式：MRM

MRM 参数：见表 2

表1 梯度洗脱程序

Time(min)	Module	Command	Value
1.50	Pumps	Pump B Conc.	1
5.00	Pumps	Pump B Conc.	30
5.01	Pumps	Total Flow	0.4
5.02	Pumps	Pump B Conc.	95
5.03	Pumps	Total Flow	1
5.83	Pumps	Pump B Conc.	95
5.85	Pumps	Pump B Conc.	1
6.20	Pumps	Total Flow	1
6.22	Pumps	Total Flow	0.4
7.00	Controller	Stop	

表2 MRM优化参数

选择的肽段	区域	MRM 通道[m/z]	Q1 Pre Bias (V)	CE (V)	Q3 Pre Bias (V)
FTFSLDTSK	重链 CDR2	523.30([M+2H] <sup>2+</sup> )→797.40(y7 <sup>+</sup> )*	-38.0	-18.0	-34.0
		523.30([M+2H] <sup>2+</sup> )→898.50(y8 <sup>+</sup> )	-38.0	-20.0	-30.0
		523.30([M+2H] <sup>2+</sup> )→650.30(y6 <sup>+</sup> )	-38.0	-19.0	-34.0
VLIYFTSSLHSGVPSR	轻链 CDR2	588.30([M+3H] <sup>3+</sup> )→775.90(y14 <sup>++</sup> )	-22.0	-17.0	-28.0
		588.30([M+3H] <sup>3+</sup> )→939.50(y9 <sup>+</sup> )	-22.0	-27.0	-28.0
		588.30([M+3H] <sup>3+</sup> )→602.30(y6 <sup>+</sup> )	-22.0	-28.0	-22.0
STAYYLQMNSLR	重链 CH1	642.30([M+2H] <sup>2+</sup> )→861.50(y7 <sup>+</sup> )	-24.0	-25.0	-20.0
		642.30([M+2H] <sup>2+</sup> )→748.40(y6 <sup>+</sup> )	-24.0	-22.0	-28.0
		642.30([M+2H] <sup>2+</sup> )→620.30(y5 <sup>+</sup> )	-24.0	-24.0	-32.0
P14R (IS)	-	512.10→292.30*	-38.0	-20.0	-20.0
		512.10→389.30	-38.0	-16.0	-28.0
		512.10→757.50	-38.0	-19.0	-38.0

注：\*表示定量离子

### 1.3 标准样品配制

取适量人空白血浆加入贝伐珠单抗储备母液，配制成浓度为 1 mg/mL 的工作母液。用空白血浆将工作母液逐级稀释，制备浓度分别为 0.146、0.293、0.586、1.17、2.34、4.69、9.38、18.8、37.5、75、150、300 μg/mL 的贝伐珠单抗血浆基质标准曲线，4℃保存，待用。

### 1.4 血浆样品制备方法

实验人员分为两组。两组实验操作人员分别按照 nSMOL 单克隆抗体质谱定量试剂盒中的血浆样品制备方法，进行样品制备。

## 结果讨论

### 2.1 线性关系

按照 1.3 项下血浆样品配制方法制备 0.146、0.293、0.586、1.17、2.34、4.69、9.38、18.8、37.5、75、150、300  $\mu\text{g/mL}$  血浆标准工作曲线, 按照 nSMOL 试剂盒操作步骤处理血浆样品, 建立标准曲线, 并用内标法进行分析测定。以血浆中贝伐珠单抗特征性肽段浓度与内标浓度 (以 1 计) 的比值 X 为横坐标, 以贝伐珠单抗特征性肽段峰面积与内标峰面积的比值 Y 为纵坐标, 权重系数为  $Y=1/C^2$ , 进行线性回归分析, 两组所得标准曲线见图 1、图 2, 线性回归方程及相关系数见表 1、表 2。结果表明贝伐珠单抗分别在 0.146-300  $\mu\text{g/mL}$  的浓度范围内线性范围良好, 两组数据对比表明, 具有较高重现性。

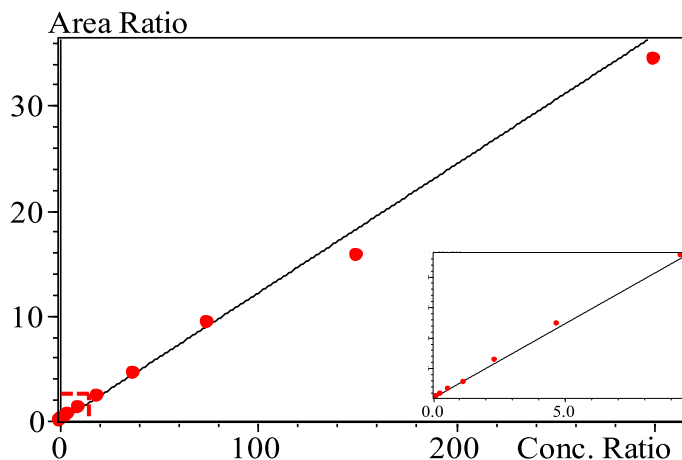


图1 组一所得贝伐珠单抗标准曲线 (FTFSLDTSK,  $m/z523.30 \rightarrow 797.40$ )

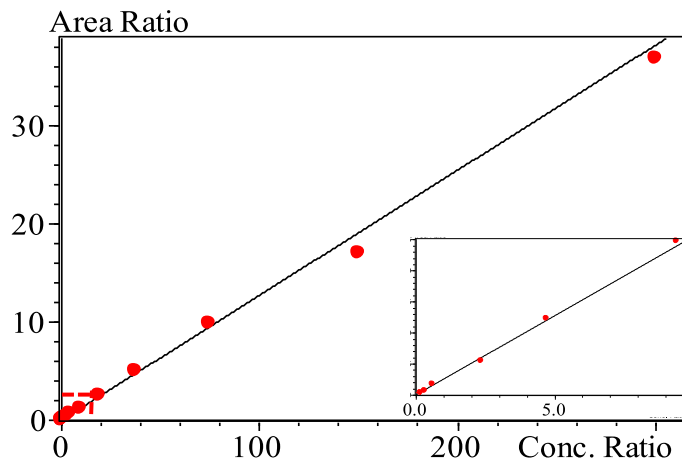


图2 组二所得贝伐珠单抗标准曲线 (FTFSLDTSK,  $m/z523.30 \rightarrow 797.40$ )

表1 贝伐珠单抗标准曲线参数(线性回归, 权重系数为 $Y=1/C^2$ )

化合物	肽段信息	线性范围 ( $\mu\text{g/mL}$ )	组别	校准曲线	准确度(%)	相关系数 r
贝伐珠单抗	FTFSLDTSK	0.146-300	组一	$Y = (0.122437)X + (0.00665970)$	85.6-110.4	0.9968
			组二	$Y = (0.125267)X + (0.00424743)$	82.7-114.2	0.9953

表2 标准曲线各浓度点准确度

级别	标准浓度 (μg/mL)	实测浓度 (ng/mL)		准确度(%)	
		组一	组二	组一	组二
1	0.146	0.139	0.147	95.4	100.7
2	0.293	0.308	0.279	105.2	95.4
3	0.586	0.634	0.680	108.2	116.0
4	1.17	1.085	0.968	92.8	82.7
5	2.34	2.584	2.159	110.4	92.3
6	4.69	5.000	4.887	106.6	104.2
7	9.38	9.586	9.860	102.2	105.1
8	18.8	19.071	19.855	101.4	105.6
9	37.5	36.420	39.311	97.1	104.8
10	75	75.924	78.403	101.2	104.5
11	150	128.452	135.845	85.6	90.6
12	300	281.443	294.504	93.8	98.2

## 结论

本实验采用 nSMOL 试剂盒成功获取人血浆中贝伐珠单抗药物特征性酶解肽段，简化并缩短了样品前处理的时间与步骤。所建贝伐珠单抗液质联用定量检测方法，实现了仅使用 5 μL 血浆样品达到 0.146 μg/mL 的定量限，线性范围为 0.146-300 μg/mL，线性关系良好。通过两组不同人员对样品进行前处理制备与定量检测，验证了采用 nSMOL 试剂盒进行样品前处理与定量分析可在不同人员间进行转移，且确保数据具有出色的重现性。实验表明，该方法具有灵敏度高、分析时间短、适用性广、实用性强等特点，并可灵活转换，为蛋白类大分子药物定量分析与新药研发提供有利的分析工具。