

nSMOL 技术用于血清中帕妥珠单抗的定量分析

LCMSMS-357

摘要： 本文使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 和三重四极杆质谱仪 LCMS-8060 联用，建立了血清中帕妥珠单抗药物的定量分析方法。血清样品经 nSMOL 试剂盒处理后，通过 Skyline 软件辅助完成 MRM 离子通道的预测和方法优化，用超高效液相色谱三重四极杆质谱联用仪 LCMS-8060 在 12 min 内完成定量分析。实验结果表明：空白血清基质干扰与帕妥珠特征定量肽段分离良好，且内标物不干扰分析物的检测；帕妥珠单抗定量肽段在 0.05~50 $\mu\text{g/mL}$ 浓度范围内的标准曲线相关系数良好 ($R=0.9988$)，标准曲线各点的准确度范围在 86.3~110.2% 之间；低中高三个浓度的质控样品 (LQC、MQC 和 HQC) 准确度范围为 86.8~96.8%，质控样本精密度相对标准偏差在 2.95~5.75% 之间；高浓度样品分析后帕妥珠定量肽段无明显残留。

关键词： LCMS-8060 nSMOL 帕妥珠单抗 Skyline 定量分析

乳腺癌是威胁妇女健康的恶性肿瘤之一，尽管乳腺癌的综合治疗水平在不断提高，其病死率仍然位居女性肿瘤的第 2 位。人表皮生长因子受体-2(HER-2) 阳性乳腺癌约占全部乳腺癌的 25%，该类乳腺癌侵袭性高、预后性差。抗 HER-2 药物的出现显著改善了该类乳腺癌的预后，如曲妥珠单抗、拉帕替尼和 T-DM1 等，但对于 HER-2 阳性晚期患者，进一步提高阳性乳腺癌患者的生存率依然是临床面临的问题。

帕妥珠单抗 (Pertuzumab) 是第一个被称作“HER 二聚化抑制剂”的一种人源性单克隆 IgG1 抗体。2012 年 6 月被 FDA 批准联合曲妥珠单抗和多西他赛用于未接受过抗 HER2 治疗或化疗的转移性乳腺癌。帕妥珠单抗作为乳腺癌的靶向治疗药物，不仅疗效显著，且能有效延

长患者的生存期。2018 年 1 月，帕妥珠单抗在中国的上市申请获得 CDE 的承办受理，并且已经获得 CFDA 优先审批的资格。

nSMOL 技术是岛津公司开发的一种全新的前处理技术，能对抗体类药物 Fab 区域进行选择性地酶解，得到相应的特征肽段。相比传统的蛋白酶解方法，nSMOL 技术大大降低了酶解后样品的复杂性，缩短了前处理时间，为实现单抗药物的高效便捷分析提供了一个强有力的前处理手段。本文基于岛津 LCMS-8060 三重四极杆液质联用系统，样品经 nSMOL 试剂盒处理后，结合 Skyline 的预测和设计，建立了该药物的 LC-MS/MS 的定量分析方法，为该药物的生物样本分析提供了一种稳定、灵敏的检测方法。

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-20A_{SR}(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. 5.91 色谱工作站，Skyline Ver.3.7.0.11317 软件。

1.2 分析条件

液相色谱条件

色谱柱：InertSustainBIO C18 (2.1 mm \times 100 mm, 1.9 μm)

流动相：A 相 -0.01% 甲酸水溶液；B 相 -0.01% 甲酸乙腈溶液

流速：0.30 mL/min

柱温：50 $^{\circ}\text{C}$

进样量：1 μL

自动进样器温度：4 $^{\circ}\text{C}$

洗脱方式：梯度洗脱，B 相初始浓度为 10%，时间程序见表 1。

表1 梯度洗脱时间程序

Time(min)	Module	Command	Value
0.50	Pumps	Pump B Conc.	10
7.50	Pumps	Pump B Conc.	40
7.60	Pumps	Pump B Conc.	90
9.50	Pumps	Pump B Conc.	90
9.51	Pumps	Pump B Conc.	10
12.00	Controller	Stop	

质谱条件:

离子源: ESI (+)

雾化气流速: 3.0 L/min

加热气流速: 15.0 L/min

接口温度: 300°C

DL 温度: 250°C

接口电压: 2.5 kV

加热模块温度: 400°C

干燥气流速: 5.0 L/min

扫描模式: 多反应监测 (MRM)

驻留时间: 30 ms

MRM 参数: 见表 2

表2 MRM参数

肽段名称	MRM 通道[m/z]	Q1 Pre	CE	Q3 Pre	肽段作用
		Bias (V)	(V)	Bias (V)	
YTGVPSPR	390.30([M+2H] ²⁺)→616.35[y6 ⁺]	-30.0	-18.0	-20.0	定性肽段
	390.30([M+2H] ²⁺)→515.10[y5 ⁺]	-30.0	-16.0	-34.0	
	390.30([M+2H] ²⁺)→359.40[y3 ⁺]	-30.0	-17.0	-14.0	
FTLSVDR	419.25([M+2H] ²⁺)→690.30[y6 ⁺]	-15.0	-17.0	-26.0	定量肽段
	419.25([M+2H] ²⁺)→589.25[y5 ⁺]*	-15.0	-16.0	-24.0	
	419.25([M+2H] ²⁺)→476.25[y4 ⁺]	-15.0	-17.0	-14.0	
LLIYSASYR	543.30([M+2H] ²⁺)→859.25[y7 ⁺]	-20.0	-19.0	-38.0	定性肽段
	543.30([M+2H] ²⁺)→746.25[y6 ⁺]	-20.0	-19.0	-30.0	
	543.30([M+2H] ²⁺)→583.30[y5 ⁺]	-20.0	-20.0	-22.0	
GLEWVADVNPNSGGSIYNQ	726.10([M+3H] ³⁺)→894.25[y8 ⁺]	-24.0	-26.0	-22.0	定性肽段
	726.10([M+3H] ³⁺)→796.40[y15 ²⁺]	-24.0	-18.0	-24.0	
	726.10([M+3H] ³⁺)→596.90[y11 ²⁺]	-24.0	-20.0	-24.0	
	726.10([M+3H] ³⁺)→870.25[b8 ⁺]	-28.0	-16.0	-28.0	
P14R	512.10([M+3H] ³⁺)→292.30[b3 ⁺]	-38.0	-20.0	-20.0	内标
	512.10([M+3H] ³⁺)→389.30[b4 ⁺]	-38.0	-16.0	-28.0	
	512.10([M+3H] ³⁺)→660.40[b6 ⁺]	-38.0	-17.0	-24.0	

*表示定量离子对

1.3 样品制备

基质标准溶液制备：将帕妥珠单抗标准品 (5 mg/mL) 用人血清基质稀释成 500 μg/mL 的标准品溶液。取上述溶液适量，用空白血清基质逐级稀释成浓度为 0.05 μg/mL、0.1 μg/mL、0.2 μg/mL、1 μg/mL、2 μg/mL、10 μg/mL 和 50 μg/mL 的标准工作液，P14R 通过 Enhanced Solution C 配制成浓度为 10 fmol/μL 的内标工作液备用。

基质质控样本制备：取 500 μg/mL 的标准品溶液适量，用空白血清基质稀释为 0.15、1、400 μg/mL 的溶液，按照 nSMOL 试剂盒进行样品前处理，获得的酶解混合物直接上机分析。

样品前处理方法：取 10 μL 血浆，按照 nSMOL 试剂盒操作步骤进行样品前处理，获得的酶解混合物直接上机分析。

■ 结果与讨论

2.1 帕妥珠单抗特征肽段的筛选

将帕妥珠单抗的 FASTA 文件导入 Skyline 软件，通过对肽段和离子对条件的设置导出帕妥珠单抗预测肽段的离子对列表，随后在 LabSolutions 软件中构建肽段筛选的 LC-MS/MS 方法，酶解产物进行上机分析后得到初步筛选结果，根据初筛结果进一步对肽段和方法进行优化后最终得到四个特异性较好的肽段，肽段分析结果见图 1。

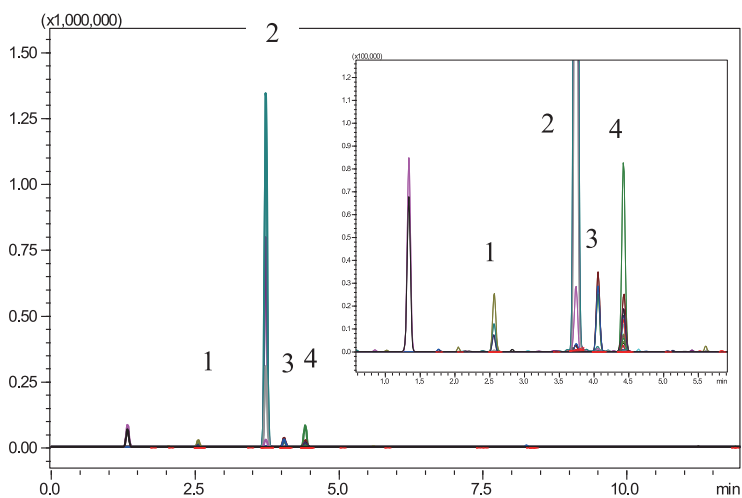


图1 特征肽段质谱图

2.2 标准样品的 MRM 色谱图

标准样品的 MRM 色谱图：

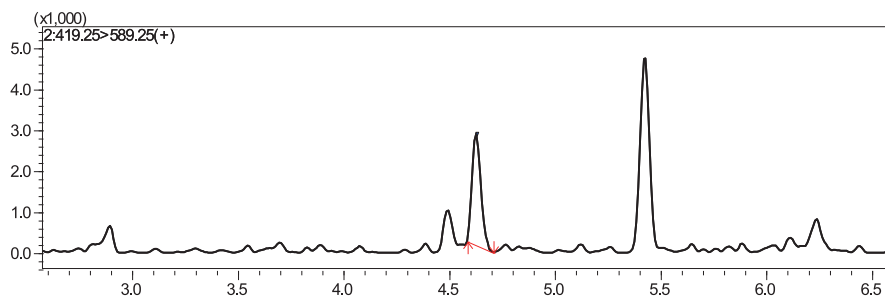


图2 定量肽段血清基质标品MRM色谱图(0.05 μg/mL)

2.3 专属性考察

按照 1.3 中的样品前处理方法制备空白血清样品和空白血清加内标样品，按照 1.2 中条件进行分析，结果表明，血清基质在内标物通道无明显色谱峰，且血清基质及内标物均对帕妥珠单抗的检测无干扰，色谱图如下所示：

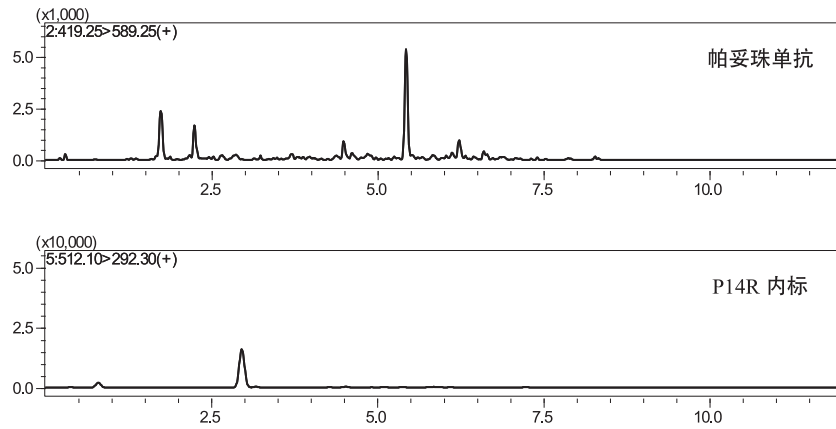


图3 空白血清基质色谱图

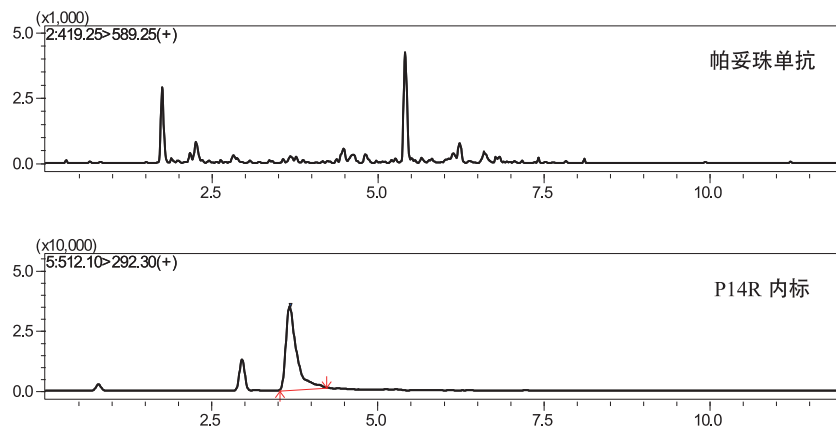


图4 空白血清基质加内标色谱图

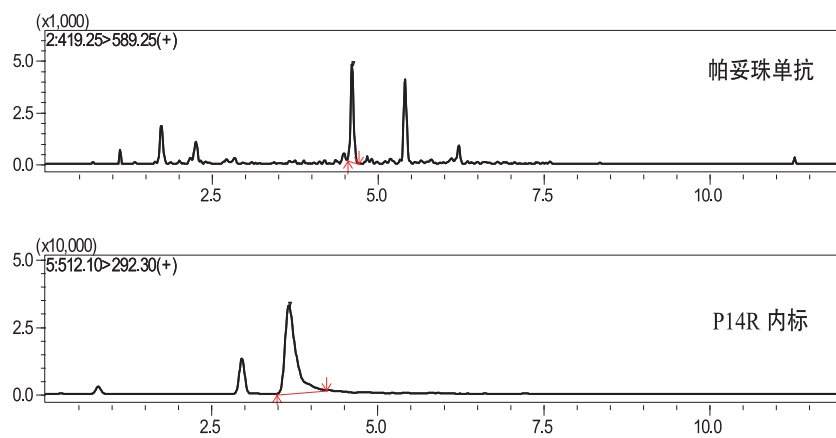


图5 帕妥珠单抗(0.1 µg/mL)血清基质加内标色谱图

2.4 线性范围

浓度为 0.05 µg/mL、0.1 µg/mL、0.2 µg/mL、1 µg/mL、2 µg/mL、10 µg/mL、50 µg/mL 的标准曲线溶液，照 1.3 中的样品前处理方法进行处理后按 1.2 中的分析条件进行测定，以内标法制作标准曲线（图 6）。定量肽段在 0.05~50 µg/mL 浓度范围内线性良好，线性方程、线性范围和相关系数见表 3。

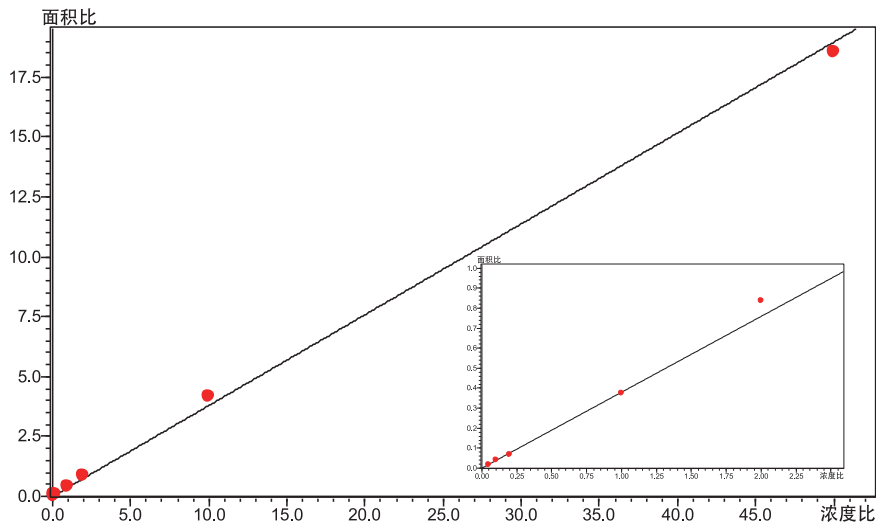


图6 标准曲线

表3 标准曲线参数

名称	特征肽段	标准曲线	线性范围 ($\mu\text{g/mL}$)	准确度 (%)	相关系数 r
帕妥珠单抗	FTLSVDR	$Y = (0.379263)X + (5.93914e-004)$	0.05-50	86.3-110.2	0.9988

2.5 精密度和准确度

用血清基质制备低、中、高三个浓度的质控样品，LQC(0.15 $\mu\text{g/mL}$)、MQC(3.0 $\mu\text{g/mL}$)和HQC(40 $\mu\text{g/mL}$)，平行测定6次，考察精密度和准确度。结果如表4所示，低中高三种不同浓度的质控品平行6次测定，定量肽段测定结果的RSD分别为5.75%、2.95%和3.06%，结果均值的准确度分别为86.8%~96.8%，说明该方法的精密度和准确度良好。

表4 精密度和准确度结果(n=6)

样品名称	理论浓度($\mu\text{g/mL}$)	RSD(%)	实测浓度($\mu\text{g/mL}$)	准确度(%)
LQC	0.15	5.75	0.130	86.8
MQC	3.0	2.95	2.66	88.5
HQC	40	3.06	38.7	96.8

2.6 残留考察

在高浓度样品(50 $\mu\text{g/mL}$)后进样分析空白基质样品，考察帕妥珠单抗的残留情况，结果如图7所示。结果表明，高浓度样品进样分析后，目标物无明显残留。

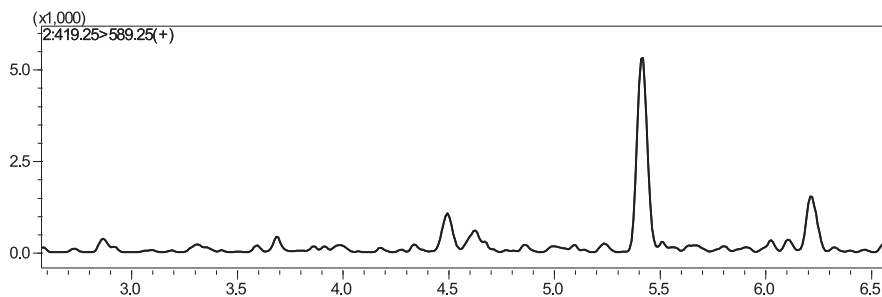


图7 残留考察

■ 结论

本文使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 和三重四极杆质谱仪 LCMS-8060 联用, 结合 nSMOL 技术及 Skyline 软件, 建立了血清中帕妥珠单抗的分析方法。实验结果显示: 在本分析系统下, 空白血清基质干扰与帕妥珠特征定量肽段分离良好, 且内标物不干扰分析物的检测; 帕妥珠定量肽段在浓度为 0.05~50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 范围内的标准曲线相关系数良好 ($R=0.9988$), 标线各点的准确度范围在 86.3~110.2% 之间; 低中高三个浓度的质控样品准确度范围为 86.8~96.8%, 精密度 RSD 在 2.95~5.75% 之间; 高浓度样品分析后帕妥珠定量肽段无明显残留。此方法具有选择性强、灵敏度高、稳定性好和线性范围宽的特点, 可为该药物的临床血清样本定量分析提供较好的借鉴和参考。