nSMOL 技术应用于血浆中阿达木单抗药物的定量检测

LCMSMS-325

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，结合 Skyline 软件，建立了血浆中阿达木单抗药物的分析方法。结果表明，浓度为 0.1~20 μg/mL(0.675 nmol/L~135 nmol/L) 范围内的标准曲线相关系数良好 (R=0.9982)，标线各点的准确度范围在 94.2~110.0% 之间。各浓度样品 (LOQ、MOQ 和 HOQ) 的批内精密度和批间精密度分别为 1.2~5.9% 和 5.7~8.3%，准确度范围为 88.5~114.2%。此方法快速、特异性好和灵敏度高，可作为阿达木单抗临床治疗药物监测的检测方法。

关键词：nSMOL 阿达木单抗 治疗药物监测 (TDM) Skyline

类风湿关节炎 (RA) 是由自身免疫引发的关节炎。以慢性、对称性、多滑膜关节炎和关节外病变为主要临床表现，属于自身免疫炎性疾病。随着 RA 发病机制的逐步揭示，针对发病机制各环节进行治疗的生物制剂，如肿瘤坏死因子 (TNF) 抑制剂等陆续进入临床应用，为 RA 患者的治疗带来了希望。

阿达木单抗 (Adalimumab)，商品名修乐美 (Humira)，由英国 Cambridge Antibody Technology 与美国雅培公司联合研制的一种 TNF 特异性重组单克隆抗体。2003 年 1 月首次在美国上市，随后相继在德国、英国和爱尔兰获准上市，用于治疗中到重度 RA。2010 年 2 月 26 日获得中国食品药品监督管理局 (CFDA) 批准上市。近年来，阿达木单抗高居全球药物销售榜首，成为最热门药物之一。

随着精准医疗概念的提出，治疗药物监测 (TDM) 越来越受到医疗工作者的关注。TDM 能为临床医生提供更准确的信息，从而实现对患者给药方案个体化，提高药物疗效，避免或减少药物毒副反应，达到最佳治疗效果。临床研究表明，单抗药物的血药浓度与患者治疗效果、存活率之间存在显著关联，这将单抗药物的 TDM 提升到一个新的高度。因此，开发血浆中阿达木单抗检测方法，用于日常监控阿达木单抗治疗的患者，有着重要临床意义。

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，并结合 Skyline 软件，建立了血浆中阿达木单抗药物的分析方法，并遵循 EMA《Guideline on bioanalytical method validation》完成方法全验证。结果表明，该方法快速、特异性好、灵敏度高，适用于阿达木单抗药物的日常监控。

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×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. 5.89 色谱工作站，Skyline Ver.3.7.0.10940 软件。

1.2 分析条件

液相色谱条件

色谱柱：ACQUITY UPLC Peptide BEH
C18 Column (2.1 mm × 150 mm, 1.7 μm)
流动相：A 相 -0.1% 甲酸水溶液；
B 相 -0.1% 甲酸乙腈溶液
流速：0.40 mL/min
柱温：40℃
进样量：15 μL
自动进样器温度：4℃
洗脱方式：梯度洗脱，B 相初始浓度为 5%，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.	5
6.50	Pumps	Pump B Conc.	65
6.60	Pumps	Pump B Conc.	95
8.00	Pumps	Pump B Conc.	95
8.10	Pumps	Pump B Conc.	5
10.00	Controller	Stop	

质谱条件：

离子源：ESI (+)

雾化气流速：3.0 L/min

加热气流速：5.0 L/min

接口温度：300℃

DL 温度：150℃

接口电压：1.0 kV

加热模块温度：400℃

干燥气流速：15.0 L/min

扫描模式：多反应监测 (MRM)

驻留时间：34 ms

MRM 参数：见表 2

表2 MRM参数

肽段选择	肽段作用	前体离子	产物离子	Q_1 Pre Bias (V)	CE (V)	Q_3 Pre Bias (V)
APYTFGQGTK	定量肽段	535.60	500.35*	-26.0	-22.0	-22.0
			305.35	-26.0	-31.0	-19.0
			490.55	-26.0	-25.0	-20.0
P14R	内标	512.10	292.30*	-38.0	-20.0	-20.0
			389.30	-38.0	-16.0	-28.0
			660.40	-38.0	-17.0	-24.0

*表示定量离子对

1.3 样品制备

标准溶液配制：将阿达木单抗注射液 (5 mg/mL) 用 Tris·HCl 缓冲液 (pH 7.0) 稀释成浓度为 2.0 μg/mL、4.0 μg/mL、10 μg/mL、20 μg/mL、40 μg/mL、100 μg/mL、200 μg/mL 和 400 μg/mL 的标准工作液，P14R 通过 Tris·HCl 缓冲液 (pH 7.0) 配制成浓度为 10 fmol/μL 的内标工作液备用。190 μL 新鲜血浆中分别加入 10 μL 阿达木单抗标准工作液，配制得到标准曲线溶液，浓度依次为 0.1 μg/mL、0.2 μg/mL、0.5 μg/mL、1.0 μg/mL、2.0 μg/mL、5.0 μg/mL、10 μg/mL 和 20 μg/mL。

样品前处理方法：取 20 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 阿达木单抗特征肽段的筛选及碰撞能量优化

利用 Skyline 软件预测阿达木单抗特征肽段，将预测的离子对列表直接导入到 LabSolutions 中建立完整的 LC-MS/MS 方法，利用该方法分析检测阿达木单抗酶解产物，然后将分析结果导入 Skyline 软件，删除未检出肽段，结果如图 1 所示。

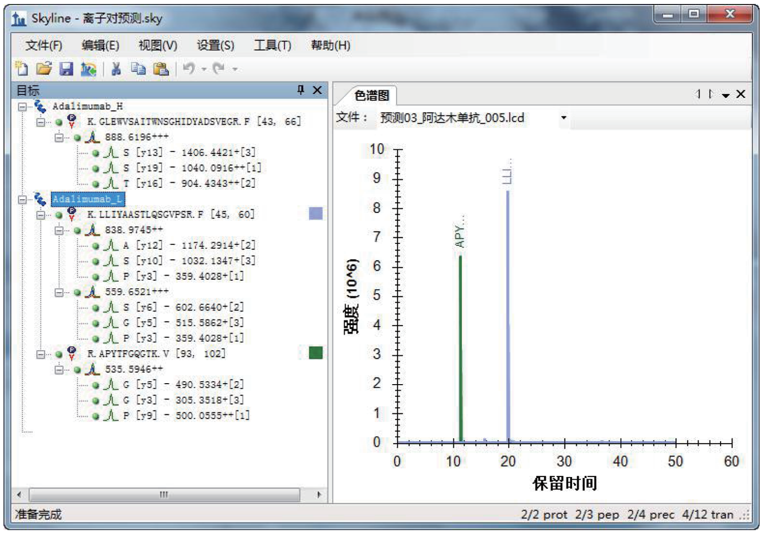


图1 筛选结果导入Skyline文件后的检出肽段确认

将 Skyline 软件中的导出参数设置为“预定模式”、“碰撞能量优化”，导出 MRM 离子对列表，基于筛选时采用的液相分离条件，同步对已筛选的 4 个肽段的 MRM 通道进行碰撞能量优化。将 LabSolutions 的分析结果导入 Skyline 软件，对碰撞能量优化结果进行确认，碰撞能量优化过程重复 1 次，不同能量下所选择肽段的 MRM 通道面积变化重复性良好 (见图 2)，最终根据两次分析的平均值导出含有最佳碰撞能量值的 MRM 离子对列表 (见表 3)。

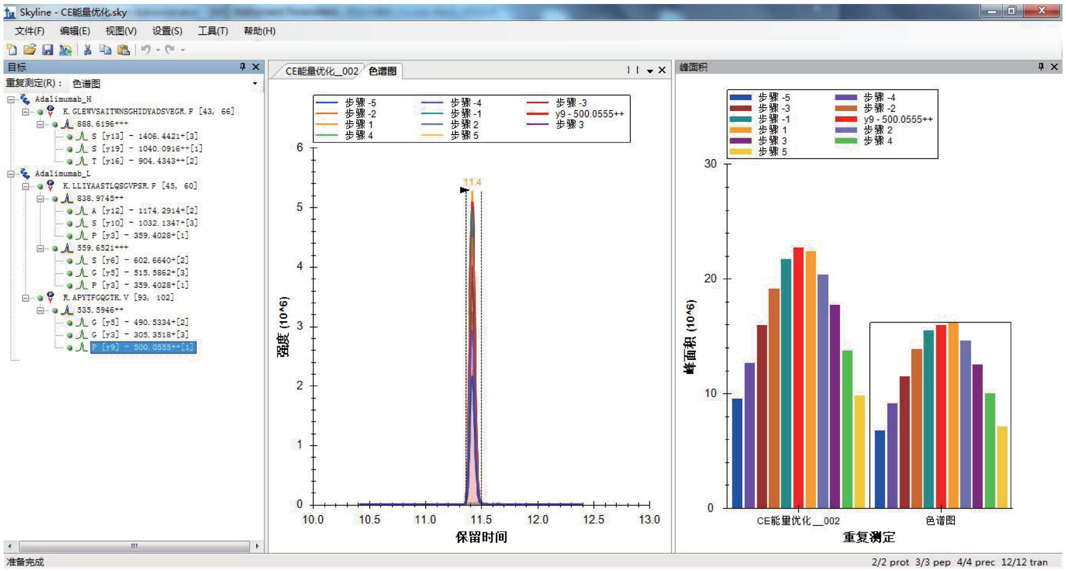


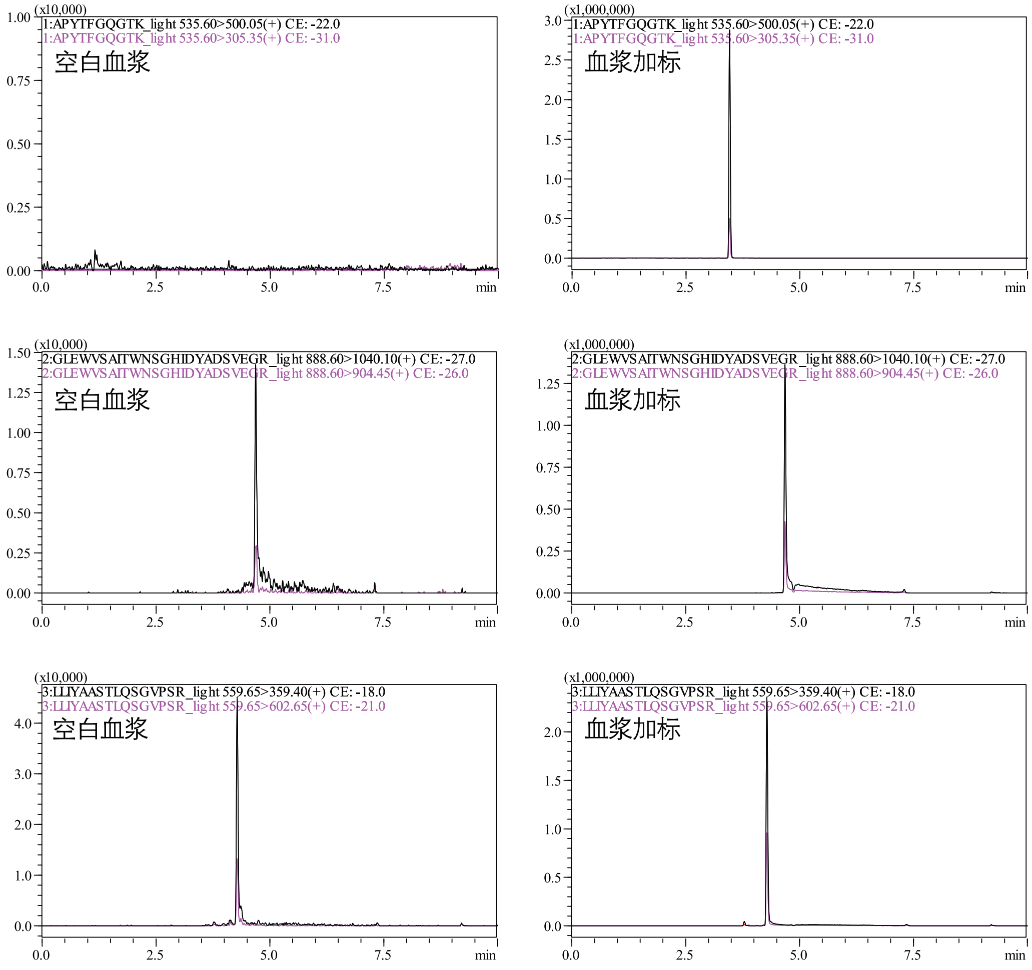
图2 Skyline软件进行碰撞能量优化结果查看

表3　MRM参数(Skyline筛选最佳碰撞能量肽段列表)

肽段选择	前体离子	产物离子	CE (V)
APYTFGQGTK	535.60 [M+2H]$^{2+}$	500.06 [y9]$^{2+}$	-22.0
		305.35 [y3]$^{+}$	-31.0
		490.55 [y5]$^{+}$	-25.0
LLIYAASTLQSGVPSR	559.65 [M+3H]$^{3+}$	359.40 [y3]$^{+}$	-18.0
		602.65 [y6]$^{+}$	-21.0
		515.60 [y5]$^{+}$	-20.0
	838.95 [M+2H]$^{2+}$	359.40 [y3]$^{+}$	-22.0
		1174.30 [y12]$^{+}$	-35.0
		1032.15 [y10]$^{+}$	-34.0
GLEWVSAITWNSGHIDYADSVEGR	888.60 [M+3H]$^{3+}$	1040.10 [y19]$^{2+}$	-27.0
		904.45 [y16]$^{2+}$	-26.0
		1460.45 [y13]$^{+}$	-37.0

2.2 空白血浆及血浆基质加标中阿达木单抗各 MRM 通道色谱图

分别对比空白血浆与血浆基质加标中各个 MRM 通道色谱图，发现在空白血浆中目标肽段 LLIYAASTLQSGVPSR 和 GLEWVSAITWNSGHIDYADSVEGR 通道均有显著干扰（如图 3 所示），因此最终选取 APYTFGQGTK 作为阿达木单抗的定量特征肽段。



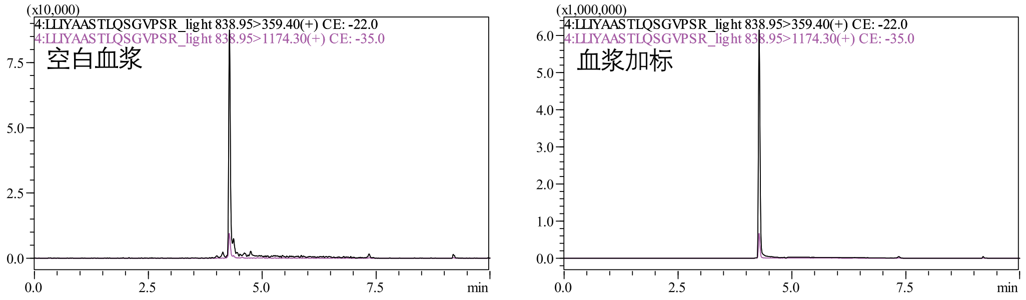


图3　空白血浆与血浆基质加标(10 μg/mL)中各个MRM通道色谱图

2.3 线性范围

浓度为 0.1 μg/mL、0.2 μg/mL、0.5 μg/mL、1.0 μg/mL、2.0 μg/mL、5.0 μg/mL、10 μg/mL 和 20 μg/mL 的标准曲线溶液，按照 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，以浓度为横坐标，峰面积比为纵坐标，内标法制作标准曲线 (图 4)。在 0.1~20 μg/mL(0.675 nmol/L~135 nmol/L) 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。

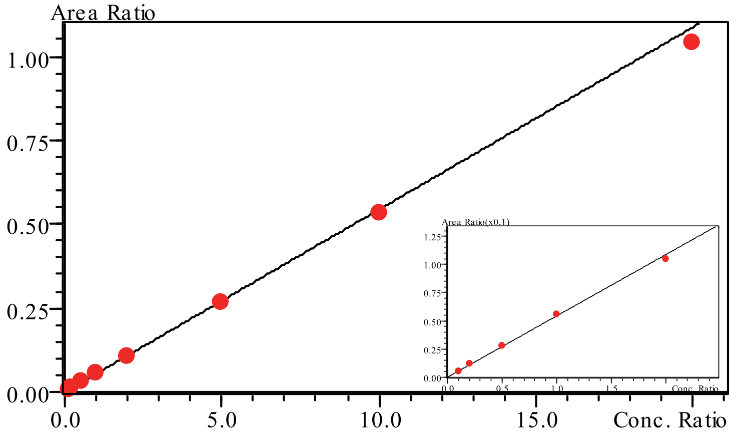


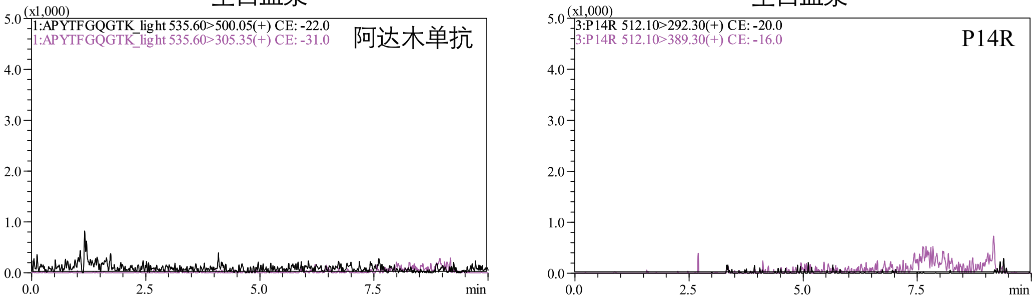
图4　标准曲线

表4　标准曲线参数

名称	特征肽段	标准曲线	线性范围 (μg/mL)	准确度(%)	相关系数 r
阿达木单抗	APYTFGQGTK	Y = (0.0543291)X + (2.64118e-005)	0.1-20	94.2-110.0	0.9982

2.4 特异性验证

分别考察空白血浆基质、血浆基质加内标和 0.1μg/mL 血浆基质加标样品，结果表明，血浆基质对阿达木单抗及其内标的检测均无干扰，同时内标 P14R 亦不干扰阿达木单抗的检测 (见图 5)。



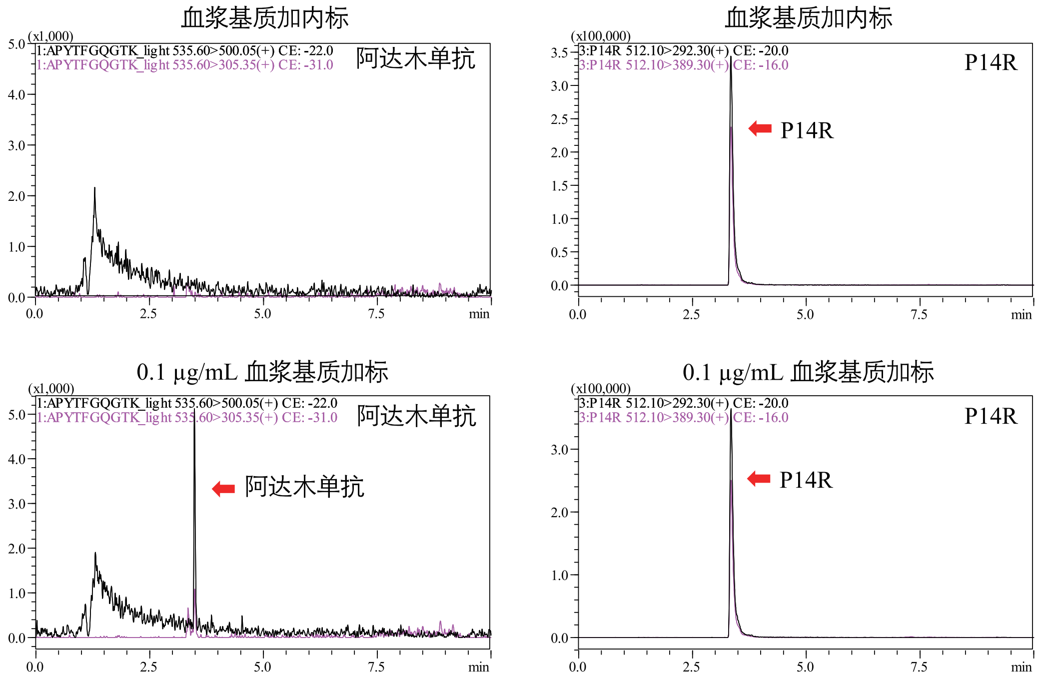


图5 特异性验证结果

2.5 精密度和准确度

用血浆基质配制定量下限、低、中、高四个浓度的样品，即 LLOQ(0.1 μg/mL)、LOQ(0.2 μg/mL)、MOQ(2.0 μg/mL) 和 HOQ(16 μg/mL)。连续三天对各样品分别测定 6 次，考察批内、批间的精密度和准确度，结果如表 5 所示。阿达木单抗的批内和批间精密度分别小于 8.3% 和 9.5%，LLOQ 批内和批间准确度在 ±20% 之内，其它浓度的质控样品批内和批间准确度分别为 88.5-110.0%、88.5-114.2%，结果均满足方法学验证标准。

表5 批内批间精密度和准确度结果

样品	理论浓度 (μg/mL)	批内 (n=6)			批间 (n=18)		
		平均实测值 (μg/mL)	CV (%)	准确度 (%)	平均实测值 (μg/mL)	CV (%)	准确度 (%)
LLOQ	0.1	0.106	8.3	91.6-116.9	0.101	9.5	82.8-116.9
LOQ	0.2	0.202	5.9	91.6-110.0	0.204	5.7	91.6-112.5
MOQ	2.0	1.88	1.8	92.5-97.1	2.03	7.2	92.5-114.2
HOQ	16	14.4	1.2	88.5-91.2	15.7	8.3	88.5-110.3

2.6 残留考察

在高浓度样品 (20 μg/mL) 后进样分析空白溶剂，考察阿达木单抗及其内标 P14R 的残留情况，结果如图 6 所示。结果表明，高浓度样品进样分析后，目标物和内标均无明显残留现象。

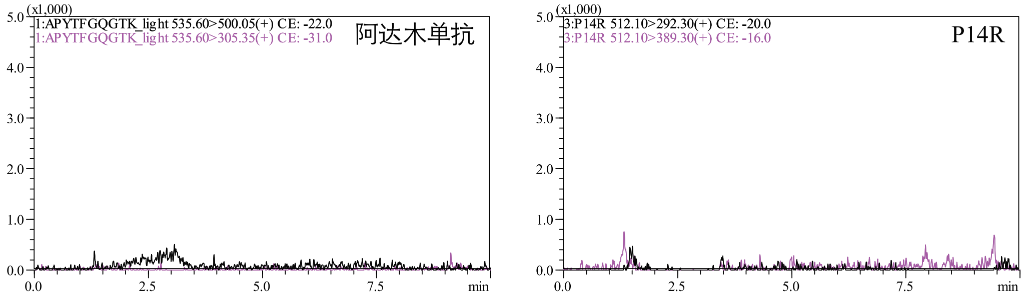


图6 残留考察

2.7 基质效应

分别考察 LOQ、MOQ 和 HOQ 样品的基质效应，并通过分析物的基质因子除以内标的基质因子 (MF)，计算得到经内标归一化的基质因子 (IS-normalized MF)，结果如表 6 所示。结果表明，低浓度和高浓度样品及其内标基质因子的 CV(%) 小于 15%，且内标归一化基质因子的 CV(%) 小于 15%。

表6　种基质效应考察

项目	LOQ		MOQ		HOQ	
	MF	IS-normalized MF	MF	IS-normalized MF	MF	IS-normalized MF
1	0.934	1.25	0.877	1.20	0.874	1.16
2	0.916	1.21	0.905	1.17	0.830	1.12
3	0.838	1.15	0.932	1.25	0.819	1.13
4	0.939	1.31	0.872	1.22	0.874	1.17
5	0.881	1.20	0.875	1.21	0.829	1.13
6	0.863	1.24	0.877	1.21	0.808	1.06
均值	0.895	1.23	0.890	1.21	0.839	1.13
V (%)	4.2	3.9	2.5	1.8	3.1	3.2

2.8 稀释可靠性

配制浓度为 100 μg/mL 血浆样品，分别用血浆基质稀释 10 倍、20 倍后，所得样品经前处理后，进样分析。样品测定结果乘以稀释因子，计算得到浓度数值与原始值比较。结果如表 7 所示，不同稀释倍数下的样品，其精密度和准确度均在 ±15% 之内，表明样品经 10 倍或 20 倍稀释后，测定结果仍然可靠。

表7　稀释可靠性验证

项目	10 倍稀释（μg/mL)	20 倍稀释（μg/mL)
1	92.3	93.4
2	97.3	99.5
3	98.6	99.5
4	100.7	97.3
5	102.1	98.4
6	99.6	97.5
均值	98.5	97.6
准确度 (%)	92.3-102.1	93.4-99.5
CV (%)	3.2	2.1

2.9 稳定性考察

分别考察室温、4℃和 -20℃条件下，不同浓度样品储存 72 h 的稳定性，结果如表 8 所示。从结果上看，准确度范围在 86.5~110.7 之间，符合验证要求。

表8 样品稳定性考察

项目	室温			4℃			-20℃		
	LOQ	MOQ	HOQ	LOQ	MOQ	HOQ	LOQ	MOQ	HOQ
1	0.207	1.90	14.5	0.183	1.78	15.2	0.221	1.86	15.6
2	0.201	1.94	14.3	0.214	1.84	14.4	0.212	1.92	15.2
3	0.183	1.90	14.2	0.208	1.84	14.5	0.214	1.92	14.9
4	0.208	1.85	14.6	0.185	1.79	14.7	0.174	1.73	15.3
准确度 (%)	91.6-101.4	92.5-97.1	88.5-90.9	91.7-106.8	86.9-92.0	90.0-94.8	86.9-110.7	86.5-96.0	93.4-97.4

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 Skyline 软件，建立了血浆中阿达木单抗药物的分析方法，并遵循 EMA《Guideline on bioanalytical method validation(2012)》完成方法全验证。实验结果显示，浓度为 0.1~20 μg/mL(0.675 nmol/L~135 nmol/L) 范围内的标准曲线相关系数良好 (R=0.9982)，标线各点的准确度范围在 94.2~110.0% 之间。各浓度样品 (LOQ、MOQ 和 HOQ) 的批内精密度和批间精密度分别为 1.2~5.9% 和 5.7~8.3%，准确度范围为 88.5~114.2%；定量下限 (LLOQ) 样品批内精密度和批间精密度分别为 8.3% 和 9.5%，准确度范围为 82.8~116.9%。此方法快速、选择性强和灵敏度高，所得结果均满足方法验证标准，可作为阿达木单抗 TDM 的检测方法。