

Nexera Mikros 微流量液质联用系统结合 nSMOL 技术用于贝伐珠单抗的分析

LCMSMS-369

摘要：本实验用岛津微流量液质联用系统 Nexera Mikros 系统建立了人血清中贝伐珠单抗的定量分析方法，同时考察了 Nexera Mikros 系统与超高效液相色谱质谱联用仪在贝伐珠单抗分析中的性能差异。血清样品经 nSMOL 试剂盒处理后，分别用 Nexera Mikros 和岛津超高效液相色谱 LC-30A 结合 LCMS-8060 三重四极杆质谱联用仪进行分析。实验结果表明：Nexera Mikros 系统下，以 0.2 μL 体积为进样量，贝伐珠定量肽段在 0.15~500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 浓度范围内的标准曲线相关系数良好 ($R=0.9975$)，标线各点的准确度范围在 87.7~112.0%；线性最低点以及低中高三个浓度的标准曲线点平行测定 6 次，保留时间的 RSD 不大于 0.34%，准确度范围为 90.1~103.5%，准确度 RSD 在 3.45~9.19% 之间。与 LC-30A 结合 LCMS-8060 三重四极杆质谱联用仪相比，二者在样品分析的重复性和准确度方面无明显差异，但在 Nexera Mikros 系统中，内标物 P14R 及定量肽段 FTFSLDTSK 的灵敏度分别约为常规半微量液相色谱质谱联用系统 LC-30A+LCMS-8060 的 13 倍和 7 倍，灵敏度得到了明显提升，且增加了线性范围。

关键词：Nexera Mikros nSMOL 贝伐珠单抗 血清

乳近年来，在药品开发过程中，进行血液中痕量成分如新药给药后的药代动力学及生物体内激素等分析时，常使用可将目标成分有效导入质谱的纳升 LC-MS 系统以获得更高的灵敏度。然而，可对应纳升级流速的 LC-MS 系统容易出现诸如管道堵塞、难以发现漏液、分析时间长等操作性、处理速度方面的问题。

Nexera Mikros 系统为岛津微流量液质联用系统，可对应从半微量流速 (100 $\mu\text{L}/\text{min}$ ~500 $\mu\text{L}/\text{min}$) 到微量流速 (1 $\mu\text{L}/\text{min}$ ~100 $\mu\text{L}/\text{min}$) 的宽流速范围。相比半微量液相色谱，Nexera Mikros 在与 LCMS 联用检测目标化合物时可以获得更高的灵敏度；与纳升 LCMS 系统相比，可以获得更短的分析时间和更好的稳定性。

目前，对生物样本中单抗浓度检测使用较多的为酶

联免疫吸附测定法 (Enzyme Linked Immunosorbent Assay, ELISA)，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。本实验中贝伐珠单抗分析采用岛津 nSMOL 技术结合 Nexera Mikros 系统共同完成。岛津自主研发的 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，简化样品前处理步骤，提高单抗药物检测的特异性。岛津微流量液质联用系统 Nexera Mikros，采用了新型微流量送液泵及样品导入质谱时的角度、位置均优化过的离子化接口，可在小体积进样的条件下，减少样品基质效应及质谱污染，实现较高的分析灵敏度。nSMOL 技术结合 Nexera Mikros 系统为单抗样本分析提供了一种稳定、灵敏的全新检测方法。

实验部分

1.1 Nexera Mikros

仪器：

岛津微流量液相色谱仪 Nexera Mikros 与三重四极杆质谱仪 LCMS-8060 联用系统。具体配置为：LC-Mikros 输液泵，DGU-20A5R 在线脱气机，SIL-30AC 自动进样器 (15 μL 定量环)，CTO-40M 柱温箱，CBM-20A 系统控制器，LCMS-8060 三重四极杆质谱仪，LabSolutions Ver. 5.93 色谱工作站。



图1 Nexera Mikros系统硬件示意图

1.2 分析条件

液相色谱条件:

色谱柱: Shim-pack MC-C18 (0.3 mm I.D.
× 50 mm L., 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: 8.0 μL/min

柱温: 55°C

进样量: 0.2 μL

自动进样器温度: 10°C

洗脱方式: 梯度洗脱, B相初始浓度为5%, 时间程序见表1。

洗针模式: 内外壁清洗, R1为0.5%FA万能洗针液, R0为0.1%甲酸水溶液。

表1 梯度洗脱时间程序

Time(min)	Module	Command	Value
0.60	泵	Pump B.Conc.	5
6.00	泵	Pump B.Conc.	30
6.10	泵	Pump B.Conc.	95
8.00	泵	Pump B.Conc.	95
8.10	泵	Pump B.Conc.	5
12.00	控制器	Stop	

质谱条件:

离子源: ESI (+)

雾化气流速: 2.0 L/min

加热气流速: 4.0 L/min

接口温度: 100°C

DL 温度: 150°C

接口电压: 4 kV

加热模块温度: 500°C

扫描模式: 多反应监测 (MRM)

驻留时间: 22 ms

MRM 参数: 见表2

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] ²⁺)→797.40(y7 ⁺)*	-20.0	-20.0	-24.0
		523.30([M+2H] ²⁺)→898.60(y8 ⁺)	-20.0	-21.0	-34.0
		523.30([M+2H] ²⁺)→650.30(y6 ⁺)	-38.0	-23.0	-34.0
VLIYFTSSLHSGVPSR	轻链 CDR2	588.40([M+3H] ³⁺)→775.90(y14 ⁺⁺)	-20.0	-19.0	-30.0
		588.40([M+3H] ³⁺)→939.70(y9 ⁺)	-22.0	-25.0	-36.0
		588.40([M+3H] ³⁺)→602.40(y6 ⁺)	-20.0	-30.0	-34.0
STAYYLQMNSLR	重链 CH1	642.40([M+2H] ²⁺)→861.50(y7 ⁺)	-24.0	-25.0	-32.0
		642.40([M+2H] ²⁺)→748.40(y6 ⁺)	-38.0	-24.0	-40.0
		642.40([M+2H] ²⁺)→620.30(y5 ⁺)	-36.0	-23.0	-36.0
P14R (IS)	-	512.40→292.50*	-36.0	-20.0	-25.0
		512.40→389.20	-30.0	-29.0	-15.0
		512.40→757.50	-30.0	-16.0	-30.0

注: *表示定量离子

1.2 LC-30A+LCMS-8060

仪器:

岛津超高效液相色谱 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-20A_{5R} 在线脱气机, SIL-30AC 自动进样器, CTO-Mikros 柱温箱, CBM-20A 系统控制器, LCMS-8060 三重四极杆质谱仪, LabSolutions Ver. 5.93 色谱工作站。

分析条件 (参考岛津应用文集 LCMSMS-246)

液相色谱条件:

色谱柱: Shim-pack GIST C18 (2.1 mm I.D. ×
50 mm L., 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: 0.4 mL/min

柱温: 50°C

进样量: 0.2 μL

自动进样器温度: 10°C

洗脱方式: 梯度洗脱, B 相初始浓度为 1%, 时间
程序见表 3。

洗针模式: 内外壁清洗, R1 为 0.5%FA 万能洗针
液, R0 为 0.1% 甲酸水溶液。

表3 MRM优化参数

Time(min)	Module	Command	Value
1.50	泵	Pump B.Conc.	1
5.00	泵	Pump B.Conc.	30
5.01	泵	T..Flow	0.4
5.02	泵	Pump B.Conc.	95
5.03	泵	T..Flow	1
5.83	泵	Pump B.Conc.	95
5.85	泵	Pump B.Conc.	1
6.20	泵	T..Flow	1
6.22	泵	T..Flow	0.4
7.00	控制器	Stop	

质谱条件 (LC-30A+LCMS-8060) :

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: 350°C

DL 温度: 200°C

干燥气流速: 5.0 L/min

加热模块温度: 400°C

扫描模式: 多反应监测 (MRM)

驻留时间: 22 ms

MRM 参数: 见表 2

1.3 样品制备

1.3.1 标准工作曲线配制

取适量正常人血清加入贝伐珠单抗储备母液, 配制成浓度为 1 mg/mL 的工作液。用空白血清将工作液逐级稀释, 制备浓度分别为 0.15、0.5、2、5、20、100、250、500 $\mu\text{g/mL}$ 的贝伐珠单抗血清基质标准曲线。

1.3.2 血清样品制备方法

按照 nSMOL 单克隆抗体质谱定量试剂盒中的血清样品制备方法, 进行样品制备。将样品分别在 LC-30A+LCMS-8060、Nexera Mikros 两套系统上进行分析测定。

结果与讨论

2.1 MRM 色谱图

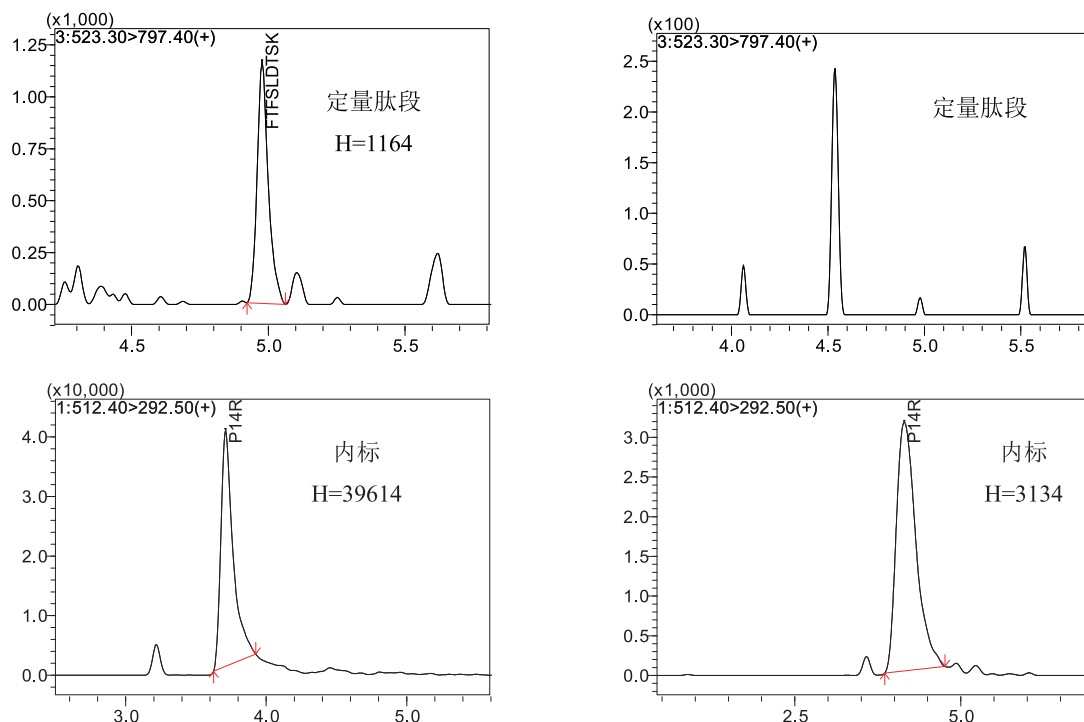
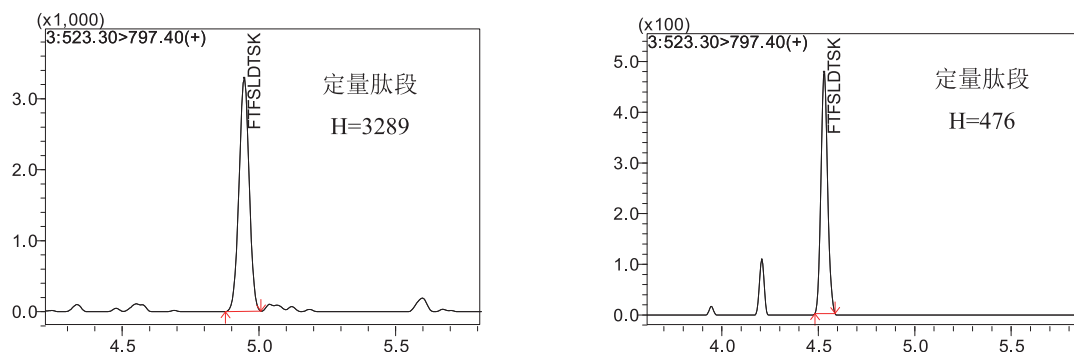


图2 0.15 ng/mL基质标准品及内标MRM色谱图 (左侧Nexera Mikros, 右侧LC-30A+LCMS-8060)



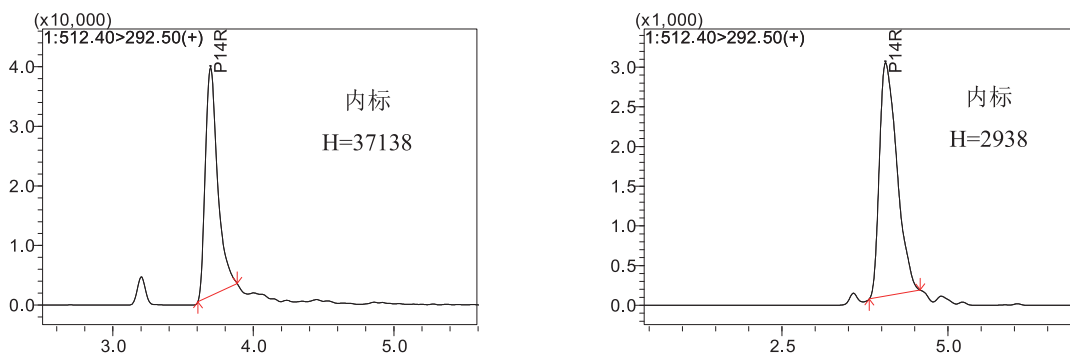


图3 0.5 ng/mL基质标准品及内标MRM色谱图 (左侧Nexera Mikros, 右侧LC-30A+LCMS-8060)

从上述图谱可知, 相同进样量下, Nexera Mikros 系统中的内标物 P14R 及定量肽段 FTFSLDTSK 的灵敏度约为常规半微量液相色谱质谱联用系统 LC-30A+LCMS-8060 的 13 倍和 7 倍。

2.2 专属性

按照 1.3 中的样品前处理方法制备空白血清样品, 按上述分析条件进行测定, 得到的色谱图如下所示, 在两种系统条件下, 空白基质在贝伐珠单抗定量肽段出峰位置无明显色谱峰, 均不干扰测定。

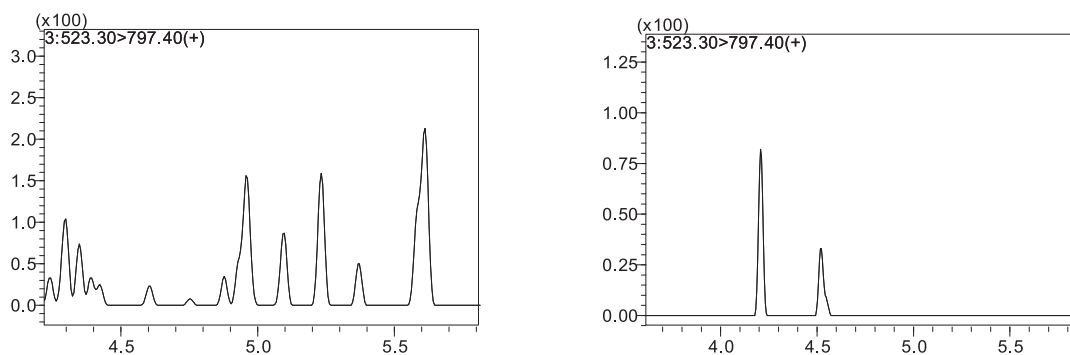


图4 空白基质MRM色谱图 (左侧Nexera Mikros, 右侧LC-30A+LCMS-8060)

2.3 线性关系

将 1.3.1 配制的 8 个标准曲线点溶液, 分别按上述分析条件进行测定, 以浓度比为横坐标, 峰面积比为纵坐标, 内标法制作校准曲线。线性方程、相关系数、线性范围及准确度范围见表 4 和图 5。结果显示, 在 Nexera Mikros 及 LC-30A+LCMS-8060 两套分析系统下, 贝伐珠单抗定量肽段分别在 0.15~500 $\mu\text{g/mL}$ 及 0.5~500 $\mu\text{g/mL}$ 浓度范围内线性关系良好, 相同条件下, Nexera Mikros 线性范围更宽。

表4 线性结果

仪器	回归方程	r	线性范围 ($\mu\text{g/mL}$)	准确度范围 (%)
Nexera Mikros	$Y = (0.0801768)X + (0.000344958)$	0.9975	0.15~500	87.7~112.0
LC-30A+LCMS-8060	$Y = (0.0433631)X + (-0.000288786)$	0.9979	0.5~500	89.8~113.6

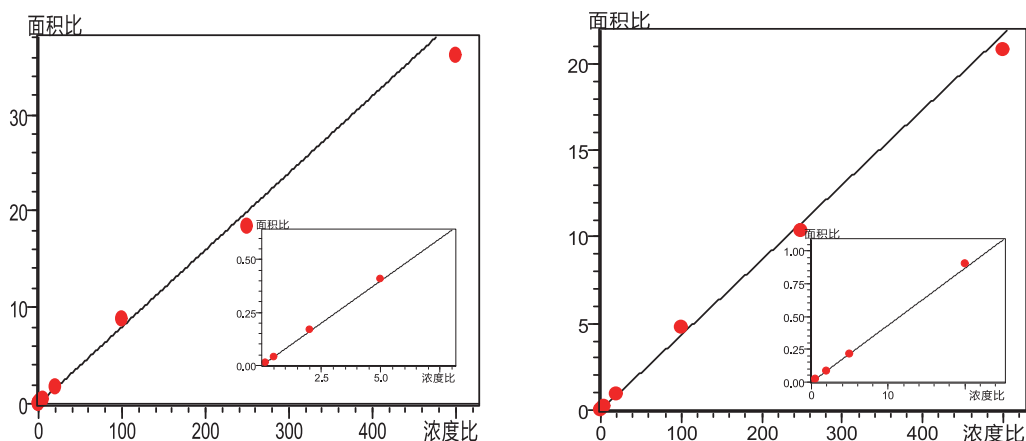


图5 血清标曲比较 (左侧Nexera Mikros, 右侧LC-30A+LCMS-8060)

2.4 重复性与准确度

将浓度分别为 0.15 $\mu\text{g/mL}$ 、0.5 $\mu\text{g/mL}$ 、20 $\mu\text{g/mL}$ 和 500 $\mu\text{g/mL}$ 的标准曲线点在两套分析系统下各平行测定 6 次, 考察重复性和准确度, 结果如表 5~6 所示, Nexera Mikros 典型重复性色谱图如图 6 所示。6 次平行测定结果显示, 在 Nexera Mikros 系统下, 贝伐珠定量肽段保留时间的 RSD 不大于 0.34%, 准确度范围为 90.1~103.5%, 准确度 RSD 在 3.45~9.19% 之间, 与常规半微量液质联用系统无明显差异, 该方法的重复性和准确度良好。

表5 Nexera Mikros重复性和准确度结果 (n=6)

理论浓度 ($\mu\text{g/mL}$)	保留时间 RSD (%)	重复性 RSD (%)	实测浓度 ($\mu\text{g/mL}$)	准确度 (%)
0.15	0.34	9.19	0.150	100.1
0.5	0.13	4.23	0.490	97.9
20	0.16	3.79	20.703	103.5
500	0.17	3.45	450.74	90.1

表6 LC-30A+LCMS-8060重复性和准确度结果 (n=6)

理论浓度 ($\mu\text{g/mL}$)	保留时间 RSD (%)	重复性 RSD (%)	实测浓度 ($\mu\text{g/mL}$)	准确度 (%)
0.15	---	---	---	---
0.5	0.09	6.57	0.508	101.5
20	0.11	3.67	20.839	104.2
500	0.42	7.14	479.982	96.0

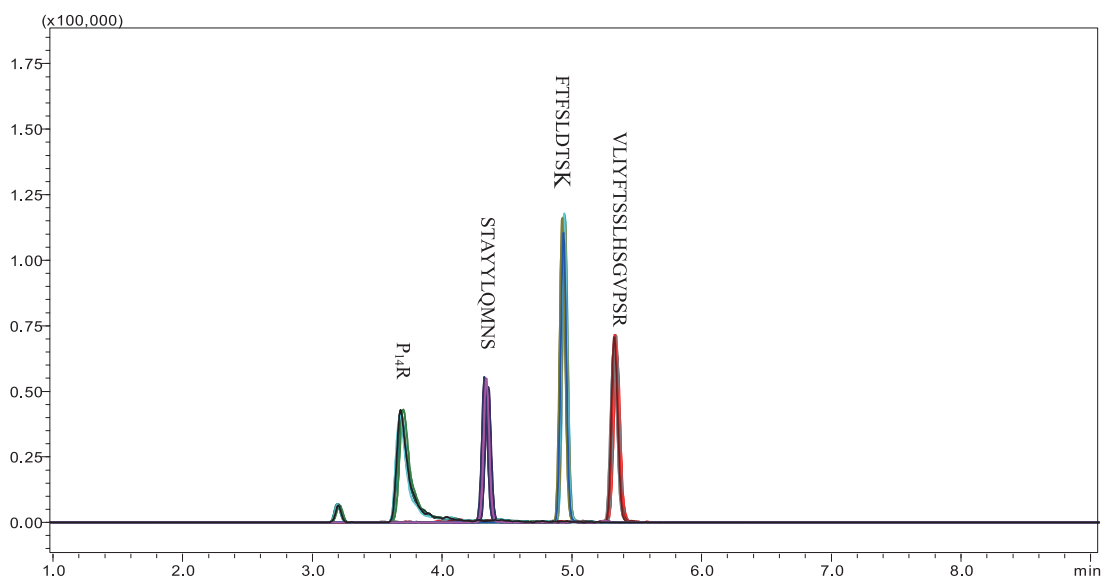


图6 Nexera Mikros重复性典型图谱 (20 µg/mL, n=6)

结论

本实验采用 nSMOL 试剂盒简化了人血清中贝伐珠单抗药物的酶解前处理过程，在岛津微流量液质联用系统 Nexera Mikros 上建立了 12 min 完成人血清中贝伐珠单抗定量的液质联用检测方法，实现了仅用 5µL 血清样品、0.2 µL 进样体积达到 0.15 µg/mL 的定量限，线性范围为 0.15~500 µg/mL，线性关系良好，相关系数大于 0.997。以线性最低点以及低中高三个浓度的标准曲线点平行测定 6 次，保留时间的 RSD 不大于 0.34%，准确度范围为 90.1~103.5%，准确度 RSD 在 3.45~9.19% 之间，重复性和准确度良好。通过与常规半微量液质联用仪 LC-30A 结合 LCMS-8060 三重四极杆质谱联用仪对比分析可知，二者在样品分析时的重复性和准确度方面无明显差异，但使用 Nexera Mikros 系统灵敏度有明显提高，其中内标物 P14R 及定量肽段 FTFSLDTSK 的灵敏度分别约为常规半微量液相色谱质谱联用系统 LC-30A+LCMS-8060 的 13 倍和 7 倍。使用岛津微流量液质联用系统 Nexera Mikros 分析贝伐珠单抗具有进样体积小、灵敏度高、易平衡、仪器污染小等特点。