

抗体药物质谱分析方法比较： nSMOL 技术 vs. 传统酶解法

LCMS-QTOF-117

摘要：随着治疗药物监测（TDM）理念的推广，对抗体类药物体内浓度进行准确定量的需求日益增加。液相色谱-质谱联用（LC-MS）技术作为抗体类药物浓度检测的重要手段之一，展现出良好的应用前景。本文以贝伐珠单抗为研究对象，基于岛津 LCMS-9050 系统与 Skyline 软件，对不同的 LC-MS 分析策略进行了比较，评估了 nSMOL 技术与传统酶解法的性能差异。从样品前处理难度、特征肽段的灵敏度和准确性、分析效率及样品洁净度四个方面进行评估，结果表明 nSMOL 法在整体性能上最优，具有高稳定性、高灵敏度和高效分析能力，为抗体药物的精准定量分析提供了可靠方法支持。

关键词：抗体药物 贝伐珠单抗 nSMOL 酶解 方法比较

技术特点：

❖ 首次对体内抗体药物质谱分析法做解读，对比了 nSMOL 技术与传统酶解法，实证后者在特异性、灵敏度与分析效率上的综合优势。

自 1986 年首个单克隆抗体（mAb）获得美国食品药品监督管理局（FDA）批准以来，单克隆抗体药物在生物制药领域迅速发展。

单克隆抗体具有高度特异性、较长的半衰期及良好的安全性，已被广泛应用于癌症、自身免疫性疾病及代谢性疾病等多种疾病的治疗。代表性药物包括：靶向 CD20 用于治疗淋巴瘤的利妥昔单抗、靶向 HER2 用于乳腺癌治疗的曲妥珠单抗，以及靶向 VEGF 用于治疗转移性结直肠癌的贝伐珠单抗等。

鉴于抗体类药物作用机制复杂，且在真实世界中的疗效与安全性数据仍相对有限，基于治疗药物监测（therapeutic drug monitoring, TDM）的个体化用药管理正逐渐成为临床关注的重点，相关机构也陆续开

展了针对抗体药物的体内定量分析研究^[1]。

在抗体药物的生物分析中，液相色谱-质谱联用（liquid chromatography-mass spectrometry, LC-MS）技术因其特异性强、灵敏度高、方法开发效率高，已经成为传统配体结合分析（LBA）的一种重要的替代或补充分析手段。

在 LC-MS 方法开发^[2]过程中，特征肽段的选择、样品前处理的可行性、方法的灵敏度及定量准确性是影响分析质量的关键因素。

本文以岛津 LCMS-9050 液质联用系统结合 Skyline 软件对质谱法检测抗体药物的三种主要技术路线进行比较分析，以供研究者参考。

■ 实验部分

1.1 仪器

本实验采用岛津四极杆飞行时间液质联用仪 LCMS-9050 系统，具体配置信息如下：

系统控制器：CBM-40lite

脱气机：DGU-405

输液泵：LC-40D XS

自动进样器：SIL-40C XS

柱温箱：CTO-40S

质谱检测器：LCMS-9050

色谱工作站：LabSolutions Ver. 5.128



图 1 LCMS-9050

1.2 分析条件

液相色谱条件：

色 谱 柱： Shim-pack Scepter Claris C18-120 (2.1mm×100mm, 1.9μm)
 P/N: 227-31210-02, 岛津（上海）实验器材有限公司
 流 动 相： A 相为 0.1% 甲酸水溶液； B 相为 0.1% 甲酸乙腈
 流 速： 0.35 mL/min
 柱 温： 50°C 进 样 量： 10 μL
 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

时间 (min)	泵 A 浓度	泵 B 浓度
1.00	95	5
16.00	80	20
25.50	45	55
26.00	10	90
28.00	10	90
30.00	5	5

质谱条件

离 子 源： ESI (+) D L 温 度： 230°C
 雾化气流速： 3.0 L/min 加热模块温度： 400°C
 加热气流速： 20.0 L/min 接 口 温 度： 290°C
 干 燥 气： 10.0 L/min 碰 撞 能 量： 10-40 V
 接 口 电 压： 4.5 kV 扫 描 模 式： MS Scan(m/z 100 -1500)
 离子源位置： +1 位 DDA MS/MS (m/z 100 -1500)

1.3 样品制备与前处理

样品制备

- (1) 抗体标液：精密称取贝伐珠单抗冻干粉，以超纯水溶解并定容至 10 mg·mL⁻¹。
- (2) 空白基质：取正常人阴性血清，用超纯水稀释至总蛋白浓度 10 mg·mL⁻¹。

(3) 基质加标样：取空白基质，加入抗体标液，使贝伐珠单抗终浓度为 $1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。

样品前处理

为系统评价 nSMOL 与传统酶解策略的性能差异，采用以下三条平行路线：

- (1) 全血清直接酶解；
- (2) 磁珠富集抗体后珠上酶解；
- (3) nSMOL 选择性蛋白酶解。

流程概览见图 2。



图 2 抗体药物物质谱定量分析流程

■ 结果与讨论

2.1 样品前处理策略与难点

在使用 LC-MS 对抗体蛋白进行定量分析时，原则上可在完整蛋白水平或蛋白水解肽段水平上进行。然而，在实际操作中，抗体蛋白常发生翻译后修饰（PTMs），这些修饰不仅会改变蛋白的分子量，还可能引入较大的分离度差异，从而影响定量结果的准确性。相比之下，在肽段水平进行定量时，所选定的特征肽段通常结构稳定、不易受修饰影响，从而能够提供更高的分析可靠性和重现性。

因此，在抗体蛋白的 LC-MS 方法开发过程中，样品的酶解策略、特征肽段的选取以及目标肽段的检测灵敏度，是影响整体分析质量的关键因素。表 2~ 表 4 分别展示了三种样品蛋白酶解策略的优缺点和难度评级，其中 nSMOL 前处理方法的操作难度显著低于其他两种方法。

表 2 样品蛋白全酶解方案优缺点和操作难度

样品蛋白全酶解	核心流程：	主要优点：
	血清直接变性→还原→烷基化→胰酶水解→ SPE 净化→上机分析	无需富集，无损失，流程短，试剂成本低
	主要缺点：	操作难度：
	高丰度蛋白稀释目标肽，基质成分复杂	★★

表 3 磁珠富集 + 酶解方案优缺点和操作难度

磁珠富集 + 酶解	核心流程:	主要优点:
	Protein A/G 磁珠捕获抗体→变性→还原→烷基化→胰酶水解→过滤收集→上机分析	特异性好, 无高丰度蛋白干扰, 非抗体蛋白基本不被酶解
	主要缺点:	操作难度:
	额外孵育、步骤繁琐、磁珠批次差异引入变异	★★★

表 4 选择性蛋白方案优缺点和操作难度

选择性蛋白酶解	核心流程:	主要优点:
	Protein A/G 树脂捕获抗体→固化胰酶水解→过滤收集→上机分析	抗体 Fc 区被树脂空间屏蔽, 固化胰酶选择性切割 Fab 区, 释放特征肽段, 酶解时间短, 背景干扰少
	主要缺点:	操作难度:
	试剂盒成本较高	★

2.2 特征肽段的准确性和灵敏度

按照 1.3 中的样品制备及前处理方法和 1.2 中分析条件采集质谱数据, 采用 Skyline 软件对原始数据进行解析。将贝伐珠单抗的蛋白序列及原始数据导入 Skyline, 用于肽段信息的识别与提取。通过对比抗体标液、空白基质与加标样品中各肽段的信号强度、保留时间及 b/y 离子匹配度, 筛选响应稳定且无基质干扰的特征肽段, 测试结果如下:

特征肽段的准确性结果如图 3 和图 4 所示:

(1) nSMOL 选择性酶解共检出 4 条贝伐珠单抗 Fab/CDR 肽段, 其中 3 条为文献^[4]已验证的定量特征肽, 假阳性、假阴性均为 0;

(2) 全血清直接酶解受高丰度基质干扰, 仅检出 1 条特征肽, 存在明显假阴性;

(3) 磁珠富集结合酶解因灵敏度不足, 仅检出 2 条特征肽, 并因背景异常误将 5 条非特征肽判定为阳性, 假阳性率最高;

特征肽段的灵敏度结果如图 5 所示, 三条重要特征肽的质谱峰强度均呈 nSMOL 选择性酶解最高: FTFSLDTSK 与 STAYLQMNSLR 为 nSMOL > 全酶解 > 磁珠富集; VLIYFTSSLHSGVPSR 为 nSMOL > 磁珠富集 > 全酶解, 表明 nSMOL 在灵敏度上具显著优势。

综合判断: nSMOL 策略在特征肽识别准确性与可靠性上显著优于传统两种方法, 适于后续转化三重四极杆质谱的 MRM 法定量。

#	肽段序列	蛋白全酶解			磁珠富集+酶解			nSMOL		
		抗体标液	空白基质	基质加标样	抗体标液	空白基质	基质加标样	抗体标液	空白基质	基质加标样
1	FTFSLDTSK	检出	未检出	未检出	检出	未检出	检出	未检出	未检出	
2	RFTFSLDTSK	检出	未检出	未检出	检出	未检出	检出	未检出	未检出	
3	STAYLQMNSLR	检出	未检出	未检出	检出	未检出	检出	未检出	未检出	
4	TKPREEQNSTYR	检出	未检出	未检出	检出	未检出	检出	未检出	未检出	
5	GLEWGWINTYTGPTYAADFK	检出	未检出	未检出	检出	未检出	检出	未检出	未检出	
6	GLEWGWINTYTGPTYAADFKR	检出	未检出	未检出	检出	未检出	检出	未检出	未检出	
7	VLIYFTSSLHSGVPSR	检出	未检出	未检出	检出	未检出	检出	未检出	未检出	

 → 漏检出特征肽段 “假阳性”
 → 检出
 → 未检出
 → 重要特征肽段

来自 Fab/CDR 区域肽段

图 3 Fab/CDR 区特征肽段检出情况对比

#	肽段序列	蛋白全酶解			磁珠富集+酶解			nSMOL		
		抗体标液	空白基质	基质加标样	抗体标液	空白基质	基质加标样	抗体标液	空白基质	基质加标样
1	FNWYVDGVEVHNAK	检出	未检出	检出	未检出	检出	检出	未检出	检出	
2	EAKVQWK	检出	未检出	检出	未检出	检出	检出	未检出	检出	
3	DIQMTQSPSSLSASVGDR	检出	未检出	检出	未检出	检出	检出	未检出	检出	
4	TVAAPSVFIFPPSDEQLK	检出	未检出	检出	未检出	检出	检出	未检出	检出	
5	VDNALQSGNSQESVTEQDSK	检出	未检出	检出	未检出	检出	检出	未检出	检出	

■ → 检出
■ → 未检出
■ → 可用于定量肽段

背景肽段丢失引起的“假阳性”

图 4 非特征肽段检出情况对比

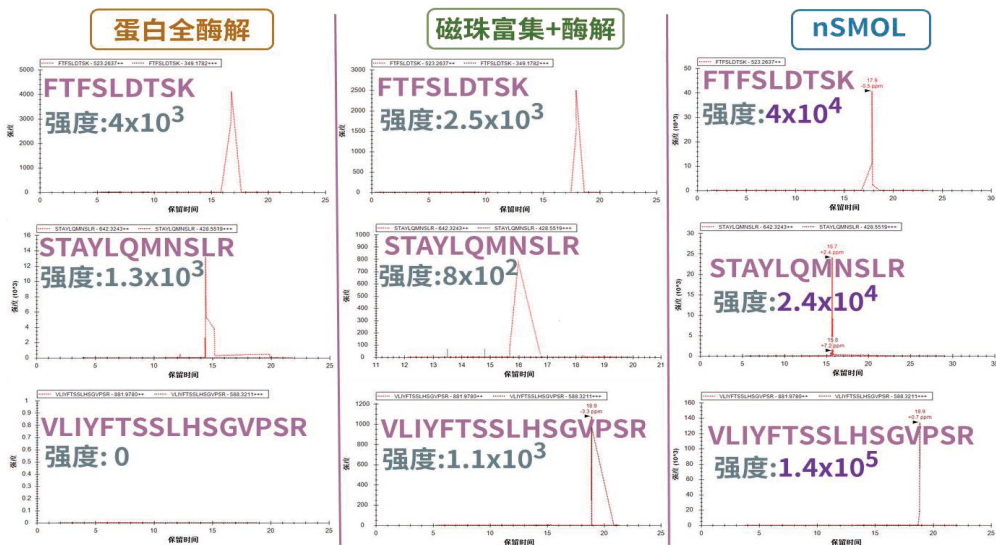


图 5 基质加标样中特征肽段的灵敏度

2.3 样品洁净度与分析效率

如图 6 所示，对比了三种不同前处理方法对样品洁净程度的影响。结果表明：

在蛋白全酶解方案中，尽管样品最终经过固相萃取（SPE）净化，但由于高丰度蛋白与目标蛋白一同酶解，产生了大量非目标多肽，导致总离子流（TIC）图谱中出现较多杂峰。这些干扰可能增强基质效应，抑制目标肽段信号，甚至引起假阳性结果。磁珠富集结合酶解方法通过特异性捕获目标蛋白，减少了杂蛋白的共酶解，明显降低了背景峰，提高了样品纯度。但由于使用传统胰酶在磁珠上进行酶解，效率有限，导致特征肽段释放不足，信号较弱，可能出现假阴性。

相比之下，nSMOL 选择性蛋白酶解方案在特异性和酶解效率方面均表现优异。它既能有效减少杂蛋白干扰，又因使用固定化胰酶提高了酶解效率，使特征肽段释放更充分，显著提升了检出率和灵敏度，更适合对灵敏度和准确性要求高的生物样本定量分析。

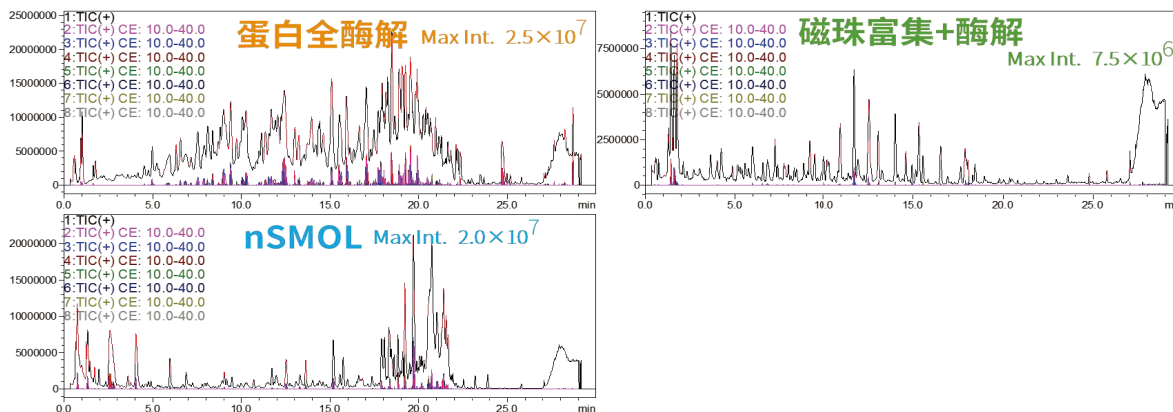


图 6 三种前处理方法下基质加标样 TIC 色谱图

如图 7 所示，三种不同前处理方法的分析效率对比结果表明：基于 nSMOL 的选择性蛋白酶解方法在分析效率上具有显著优势。其与蛋白全酶解方案和磁珠富结合酶解相比，时间成本大幅缩减 72%，展现出更高的操作效率和应用潜力。



图 7 三种前处理方法的分析效率

■ 结论

本文基于岛津 LCMS-9050 液质联用系统，结合 Skyline 软件分析平台，以血清中的贝伐珠单抗为研究对象，从样品前处理方法的难度、特征肽段的灵敏度与准确性、方法的分析效率以及样品洁净度四个关键维度，系统比较了蛋白全酶解法、磁珠富集酶解法和 nSMOL 法的分析性能。结果表明，nSMOL 法在各项评价指标中均表现出显著优势，具备稳定性好、可靠性高、灵敏度强和分析效率高的特点，有望成为抗体药物生物分析领域的优选方法，推动 LC-MS 技术在个体化用药中的应用。

■ 参考文献

- [1]. 中国药理学会, 中日友好医院. 《抗肿瘤生物类似药治疗药物监测药学专家共识 (2020 版)》解读 [J]. 中国医院用药评价与分析, 2020, 20(5): 513-517, 520.
- [2]. 高宇雄, 钟大放. 抗体药物 LC-MS 法生物分析进展. 药学学报 [J], 2020, 55(3): 453-462.
- [3]. Millet A, Khoudour N, Lebert D, et al. Development, Validation, and Comparison of Two Mass Spectrometry Methods (LC-MS/HRMS and LC-MS/MS) for the Quantification of Rituximab in Human Plasma [J]. Molecules 2021, 26, 1383.
- [4]. Vialaret J, Broutin S, Pugnier C, et al. What sample preparation should be chosen for targeted MS monoclonal antibody quantification in human serum? Bioanalysis. 2018;10(10):723-735.

岛津应用云

