

# 一种简单通用的人血清中多种单抗的液质分析策略

## A Simple and Generic Sample Preparation Method for Analysis of Eight Therapeutic Monoclonal Antibodies with SCIEX LC-MS/MS

胡凤梅, 刘丹, 黄超, 赵祥龙, 郭立海

Hu Fengmei, Liu Dan, Huang Chao, Zhao Xianglong, Guo Lihai

上海爱博才思分析仪器贸易有限公司

**Keywords:** Trastuzumab; Bevacizumab; Cadonilimab; Pertuzumab; Rituximab; Adalimumab; Ustekinumab; Infliximab; LC-MS/MS

### 引言

随着临床使用抗体类生物药的日益增多, 越来越需要一种可靠的、通用性强和操作简便的分析方法来进行抗体药的血液浓度监测。目前, 抗体类生物药定量方法应用最广的仍然是基于ELISA方法, 然而该方法在使用过程中存在诸多的限制, 因此开发一种简单、通用的方法来准确定量血清中的抗体药物浓度具有非常迫切和实际的临床应用意义。

液相色谱串联质谱法(LC-MS/MS)因其方法开发快速、线性范围较宽、特异性较高和多通道定量的优势, 已然成为ELISA的有吸引力的替代方案。然而, 在LC-MS/MS分析中, 选择一种合适的

样品制备策略是富有挑战性的, 常用策略组合有酶解结合SPE净化、免疫亲和富集结合酶解等, 但这些方案都面临着诸多使用限制, 比如需要SPE或磁珠等花费较大的耗材, 需要特殊样品制备设备辅助等。

本方案基于SCIEX液相色谱串联质谱系统, 优化并搭建了直接酶解的前处理策略, 无需特殊富集和净化耗材、耗时短、通用性好, 可以有效满足临床抗体类生物药检测需求。

### 样品信息

曲妥珠单抗、贝伐珠单抗、卡度尼利、帕妥珠单抗、利妥昔单抗、阿达木单抗、乌司奴单抗、英夫利昔单抗和维得利珠单抗的信息如表1所示, 其中维得利珠单抗作为实验用内标。化合物相关信息如下:

表1. 化合物信息列表

中文名	英文名	缩写	CAS编号	分子式
帕妥珠单抗	Pertuzumab	PERT	380610-27-5	C <sub>6476</sub> H <sub>9954</sub> N <sub>1710</sub> O <sub>2016</sub> S <sub>44</sub>
卡度尼利	Cadonilimab	CADO	2394841-59-7	C <sub>8772</sub> H <sub>13504</sub> N <sub>2384</sub> O <sub>2768</sub> S <sub>62</sub>
曲妥珠单抗	Trastuzumab	TRAS	180288-69-1	C <sub>6470</sub> H <sub>10012</sub> N <sub>1726</sub> O <sub>2013</sub> S <sub>42</sub>
贝伐珠单抗	Bevacizumab	BEVA	216974-75-3	C <sub>6638</sub> H <sub>10160</sub> N <sub>1720</sub> O <sub>2108</sub> S <sub>44</sub>
利妥昔单抗	Rituximab	RITX	174722-31-7	C <sub>6416</sub> H <sub>9874</sub> N <sub>1688</sub> O <sub>1987</sub> S <sub>44</sub>
阿达木单抗	Adalimumab	ADAM	331731-18-1	C <sub>6428</sub> H <sub>9912</sub> N <sub>1694</sub> O <sub>1987</sub> S <sub>46</sub>
乌司奴单抗	Ustekinumab	USTE	815610-63-0	C <sub>6482</sub> H <sub>10004</sub> N <sub>1712</sub> O <sub>2016</sub> S <sub>46</sub>
英夫利昔单抗	Infliximab	IFLX	170277-31-3	C <sub>6428</sub> H <sub>9912</sub> N <sub>1694</sub> O <sub>1987</sub> S <sub>46</sub>
维得利珠单抗	Vedolizumab	VEDO	943609-66-3	C <sub>6428</sub> H <sub>10072</sub> N <sub>1732</sub> O <sub>2042</sub> S <sub>42</sub>

## 实验部分

### 样品前处理

本实验采用直接酶解法进行样品前处理，经酸终止反应后进行样分析。操作流程如下：

第一步，去除高丰度蛋白；

第二步，对包含抗体在内的蛋白进行变性、还原、烷基化处理；

第三步，加入胰酶，对包含目标单抗的蛋白进行酶解；

第四步，加入酸终止酶解反应，取样上机分析。

### 色谱条件

色谱柱：Aeris PEPTIDE XB-C18, Phenomenex；

流动相：A相为含酸水溶液，B相为含酸乙腈溶液；

流速：0.3 mL/min；

柱温：40 °C；

洗脱方式：梯度洗脱，见表2。

表2. 液相梯度洗脱条件

时间 ( min )	A (%)	B (%)
0	90	10
1.0	90	10
7.5	65	35
8.0	10	90
10.0	10	90
10.1	90	10
12.0	90	10

### 质谱条件：

质谱平台：SCIEX LC-M/MS

电离方式：电喷雾离子源，正离子模式；

检测方式：多反应监测 (MRM)；

离子源温度 (TEM): 600 °C； 雾化气 (Gas1): 65 psi；

辅助气 (Gas2): 60 psi； 气帘气 (Curtain Gas): 30 psi；

电喷雾电压：5500 V；

对应MRM通道及参数见表3。

表3. 待测单抗的质谱参数

Name	ID	Q1	Q3	DP	CE	肽段选择
帕妥珠单抗	PERT-1-1*	419.2	589.3	80	19.5	FTLSVDR
	PERT-1-2	419.2	476.2	80	22.5	
卡度尼利	CADO-1-1*	568.3	871.4	80	23.8	YTYPPDSVK
	CADO-1-2	568.3	708.4	80	26.8	
曲妥珠单抗	TRAS-1-1*	485.2	721.4	80	22.8	FTISADTSK
	TRAS-1-2	485.2	608.3	80	25.8	
贝伐珠单抗	BEVA-1-1*	523.3	797.4	80	24.6	FTFSLDTSK
	BEVA-1-2	523.3	563.3	80	27.6	
利妥昔单抗	RITX-1-1*	803.9	926.5	80	44.4	FSGSGSGTYSYSLTISR
	RITX-1-2	803.9	839.5	80	41.4	
阿达木单抗	ADAM-1-1*	535.3	901.4	80	28.2	APYTFGQGTK GLDWIGIMSPVSDIR
	ADAM-1-2	535.3	637.3	80	22.2	
乌司奴单抗	USTE-1-1*	887.4	1019.5	80	42.5	GLEWVAEIR
	USTE-1-2	887.4	888.4	80	44.5	
英夫利昔单抗	IFLX-1-1*	536.8	587.4	80	25.3	LEWIGEIDPSESNTNYNQK
	IFLX-1-2	536.8	773.4	80	25.3	
维得利珠单抗	VEDO	1119.0	956.4	80	44.8	

\*：为定量离子对

## 结果与讨论

本实验方案采用直接酶解结合特异性肽段进行定量的分析策略，其中特异性肽段是根据skyline软件结合高分辨的实际分析结果选择得到的。在本方案液相洗脱梯度条件下，八种单抗肽段不存在互相干扰，峰形对称，响应良好。典型液相色谱图如图1。

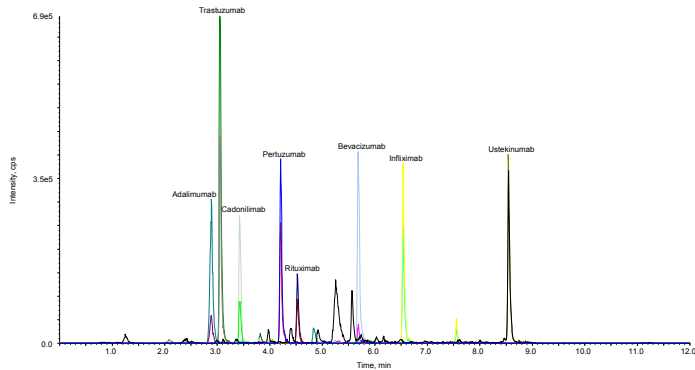


图1. 8种单抗的典型液相色谱图

## 标准曲线

以空白血清作为基质，配制标准工作曲线。各待测物在各自的线性范围内线性良好， $r^2 > 0.99$ ，符合生物样本检测的通用要求。具体结果见表4。

表4. 8种单抗的线性范围及标准曲线示例

化合物	线性范围 ( $\mu\text{g/mL}$ )	回归方程 (相关系数r)
帕妥珠单抗	0.200-100	$Y=0.05264 X + 0.00155$ ( $r=0.99732$ )
卡度尼利	0.200-100	$Y=0.03152 X + 0.00257$ ( $r=0.99531$ )
曲妥珠单抗	0.200-100	$Y=0.08478 X + 0.05833$ ( $r=0.99797$ )
贝伐珠单抗	0.200-100	$Y=0.05663 X + 0.00517$ ( $r=0.99874$ )
利妥昔单抗	0.200-100	$Y=0.02114 X + 0.00270$ ( $r=0.99563$ )
阿达木单抗	1-100	$Y=0.05135 X + 0.23169$ ( $r=0.99740$ )
乌司奴单抗	0.200-100	$Y=0.05032 X + 0.01131$ ( $r=0.99893$ )
英夫利昔单抗	0.200-100	$Y=0.02948 X + 0.02015$ ( $r=0.99605$ )

## 加标准确度

以混合实际人血清加标的形式制备质控样本，对8种单抗药物定量的准确度进行验证。从表5可以看出，不同浓度质控样本的准确度均在85.0~115.0%之内，满足CLSI相关法规要求。具体结果见表5。

表5. 血清中8种单抗的加标准确度

化合物名称	实际浓度 ( $\mu\text{g/mL}$ )	检测浓度 ( $\mu\text{g/mL}$ )	准确度%	平均准确度%	
帕妥珠单抗	5.00	4.94	98.7	100.4	
		5.13	102.6		
	10.0	5.00	99.9		105.9
		10.8	108.0		
		10.4	104.4		
		10.5	105.3		
	50.0	54.6	109.3		105.7
		52.4	104.8		
		51.5	103.1		
		4.70	93.9		
卡度尼利	5.00	5.05	101.0	97.0	
		4.798	96.0		
	10.0	9.97	99.7		109.4
		11.491	114.9		
		11.365	113.6		
		56.13	112.3		
	50.0	55.9	111.8		108.6
		50.9	101.7		
		5.59	111.8		
		5.55	110.9		
曲妥珠单抗	5.00	5.22	104.4	109.0	
		10.7	107.0		
	10.0	11.1	111.0		109.3
		11.0	109.9		
		54.0	107.9		
		50.0	56.0		
	50.0	53.3	106.6		108.9
		5.45	108.9		
		5.73	114.7		
		5.21	104.3		
贝伐珠单抗	5.00	10.0	99.6	109.3	
		10.7	107.1		
	10.0	11.4	113.6		106.8
		10.7	107.1		
		49.6	99.2		
		50.0	51.8		
	50.0	47.2	94.4		99.1

表5. 血清中8种单抗的加标准确度 (续)

化合物名称	实际浓度 ( $\mu\text{g/mL}$ )	检测浓度 ( $\mu\text{g/mL}$ )	准确度%	平均准确度%
利妥昔单抗	5.00	5.47	109.4	108.7
		5.65	113.0	
		5.18	103.6	
	10.0	9.81	98.1	
		11.4	114.1	
		11.4	113.9	
50.0	45.7	91.4	90.7	
	44.6	89.2		
阿达木单抗	5.00	45.8	91.6	107.7
		5.37	107.4	
		5.40	108.0	
	10.0	5.38	107.6	
		11.06	110.6	
		11.39	113.9	
50.0	11.08	110.8	95.7	
	47.9	95.7		
	47.9	95.9		
乌司奴单抗	5.00	47.7	95.4	106.9
		5.21	104.1	
		5.58	111.5	
	10.0	5.26	105.2	
		10.8	108.5	
		10.9	108.6	
50.0	10.7	106.7	104.6	
	51.8	103.7		
	54.6	109.2		
英夫利昔单抗	5.00	50.5	100.9	102.6
		4.95	99.0	
		4.97	99.4	
	10.0	5.47	109.3	
		9.38	93.8	
		10.4	104.1	
50.0	9.86	98.6	108.3	
	56.1	112.2		
	54.5	108.9		
		51.9	103.8	

## 方案优势

本方案具有以下优势:

- 简单快速, 整个前处理过程仅需4-5小时, 且操作简单
- 基于一般实验室通用的方法开发流程, 无需特殊仪器和耗材
- 采用单抗药物作为内标, 对整个样本分析过程进行校正, 经济简便易实现

## 总结

本方案基于SCIEX液质联用平台, 实现了对八种单抗的同时定量检测, 其中样品制备采用了经优化的直接酶解策略, 简单、经济, 通用性高。本方案方法线性良好, 加标准确度满足要求, 可用于抗体类药物研发、临床前药代动力学研究以及临床实际样本的检测。

仅限专业展会等使用、仅向专业人士提供的内部资料

SCIEX临床诊断产品线仅用于体外诊断。仅凭处方销售。这些产品并非在所有国家地区都提供销售。获取有关具体可用信息, 请联系当地销售代表或查阅<https://sciex.com.cn/diagnostics>。所有其他产品仅用于研究。不用于临床诊断。本文提及的商标和/或注册商标, 也包括相关的标识、标志的所有权, 归属于AB Sciex Pte. Ltd. 或在美国和/或某些其他国家地区的各权利所有人。

© 2023 DH Tech. Dev. Pte. Ltd. RUO-MKT-29354-A



### SCIEX中国

北京分公司  
北京市朝阳区酒仙桥中路24号院  
1号楼5层  
电话: 010-5808-1388  
传真: 010-5808-1390  
全国咨询电话: 800-820-3488, 400-821-3897

上海公司及中国区应用支持中心  
上海市长宁区福泉北路518号  
1座502室  
电话: 021-2419-7201  
传真: 021-2419-7333  
官网: [sciex.com.cn](http://sciex.com.cn)

广州办公室  
广州国际生物岛星岛环北路1号  
B2栋501、502单元  
电话: 020-8842-4017

官方微信: [SCIEX-China](https://www.sciex.com.cn)