

# SCIEX 液质联用结合两步沉淀法检测血浆中曲妥珠单抗

## A two-step precipitation method for detection of Trastuzumab in plasma with SCIEX LC-MS/MS System

陈炎, 黄超, 赵祥龙, 郭立海

Chen Yan, Huang Chao, Zhao Xianglong, Guo Lihai

**Key words:** Trastuzumab, plasma, LC-MS/MS

### 引言

曲妥珠单抗是一种基于重组DNA技术的人源化单克隆抗体 (monoclonal antibody, mAb), 适用于HER阳性的早期乳腺癌、转移性乳腺癌和转移性胃癌的治疗。研究表明, mAbs的药代动力学和药效动力学过程复杂, 具有非线性动力学特性, 个体暴露差异大。曲妥珠含量的准确定量, 对基于个体的药代动力学研究和个体化治疗有重要的临床意义。

mAbs的传统生物分析方法众多, 其中以酶联免疫吸附法 (enzyme linked immunosorbent assay, ELISA) 最为广泛, 该方法简单快速、通量较高, 但存在定量范围窄 (约2个数量级)、方法开发难度大、交叉免疫、非特异性结合等缺点, 限制了其应用。LC-MS/MS作为小分子化合物定量的金标准, 得到了大量的关注, 其具有特异性强、准确度高、线性范围宽的优点。事实上, 近年来LC-MS/MS在大分子定量领域也发展迅速, 已有基于LC-MS/MS的方法用于单抗药物的监测, 其前处理包括磁珠法、固相萃取法等。

本文结合LC-MS/MS的检测技术, 开发了两步沉淀酶解法对曲妥珠在人血浆中的含量进行定量。该方案相较于磁珠法和固相萃取法, 降低了实验成本, 减少了实验操作步骤, 具有较好的通用性, 其灵敏度也能满足临床应用需求。

### 实验部分

#### 1. 样品前处理:

1) 准确量取10  $\mu$ L血浆样品于1.5 mL离心管中, 加入适量Tris-盐酸溶液, 然后加入适量的盐溶液, 涡旋混匀1 min, 15  $^{\circ}$ C 4000G离心5 min, 离心后弃去上清溶液;

2) 取蛋白沉淀层, 加入50  $\mu$ L 7 mol/L盐酸胍溶液 (含20 mM二硫苏糖醇DTT) 复溶, 于60  $^{\circ}$ C还原变性30 min;

3) 蛋白经变性后, 加入20  $\mu$ L 100 mM碘乙酰胺IAM水溶液, 避光反应30 min;

4) 待反应完成后, 加入适量的水和醇溶液, 混匀后4000 G离心5 min, 再次弃去上清;

5) 加入90  $\mu$ L 50 mM的Tris-盐酸溶液复溶蛋白, 加入20  $\mu$ L 1  $\mu$ g/mL胰蛋白酶, 37  $^{\circ}$ C过夜酶解;

6) 待酶解完成后, 加入甲酸溶液终止反应, 混匀后进样分析。

#### 2. 色谱质谱条件:

色谱条件: 色谱柱: Kinetex 2.6  $\mu$ m C18, 50  $\times$  2.1mm, 流动相: A: 0.1%甲酸水溶液, B: 0.1%甲酸甲醇溶液, 柱温: 40  $^{\circ}$ C, 进样量: 5  $\mu$ L, 梯度洗脱, 液相梯度见表1。

表1. 色谱柱液相梯度洗脱条件

时间 (min)	A(%)	B(%)
0.0	90	10
1.0	90	10
4.0	10	90
5.0	10	90
5.1	90	10
6.0	90	10

质谱条件: ESI源, 正离子模式, SCIEX 液质联用系统

气帘气 CUR: 35 psi      碰撞气 CAD: Medium

雾化气 GS1: 60 psi      辅助气 GS2: 60 psi

IS电压: 5500 V      源温度 TEM: 600  $^{\circ}$ C

质谱参数见表2

表2. 目标组分的质谱参数

分析物	Q1	Q3	Dwell time	ID	DP	CE
Trastuzumab	363.9*	597.3*	100	Trastuzumab-1	50	21.5
	542.8	808.4	100	Trastuzumab-2	60	28.6

\* 定量离子

## 结果与讨论

### 1. 灵敏度

以空白血浆为基质，考察曲妥珠的线性范围最低点灵敏度和峰形情况，结果表明化合物灵敏度高、峰形良好，特征图谱见图1。

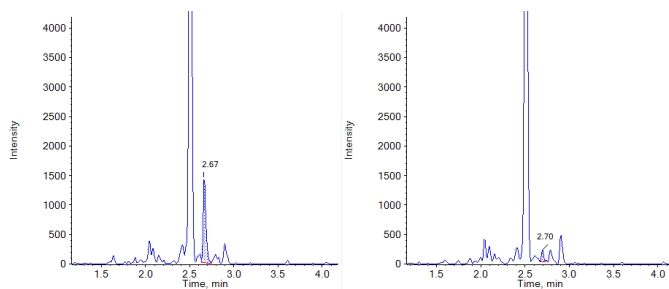


图1. 曲妥珠定量下限（左）和空白血浆（右）色谱图

### 2. 线性

以空白人血浆为基质，配制混合标曲溶液，按上述前处理步骤进行处理，制作标准工作曲线。图2显示，曲妥珠在1 - 100 µg/mL均具有良好的线性，其回归系数 $r > 0.999$ 。

### 3. 准确度和精密度

为了考察该检测方法的准确性和精密度，向血浆中添加低、中、高三个浓度的工作溶液计算加标回收率，表3显示，不同浓度水平的加标回收率在88.7~103.2%之间，回收率良好；另不同浓度

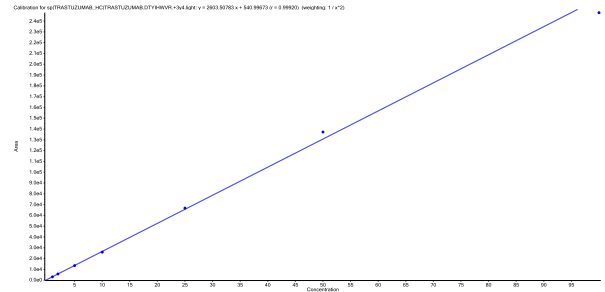


图2. 曲妥珠1 ~ 100 µg/mL线性

表3. 加标回收率和精密度实验结果 (%)

化合物	理论加标浓度	批内准确度	批间准确度	批内精密度	批间精密度
曲妥珠	2 µg/mL	95.2		12.8	
		95.0	93.5	0.0	7.7
		90.4		3.6	
	10 µg/mL	103.2		5.6	
		94.4	95.4	7.5	8.5
		88.7		6.4	
50 µg/mL	97.7		3.8		
	99.4	97.6	3.0	3.8	
	95.6		3.6		

水平的批内RSD为0.0~12.8%之间，批间RSD为3.8%~8.5%，精密度良好。

## 总结

本方案基于SCIEX Triple Quad™系统，建立了血浆中曲妥珠含量测定的LC-MS/MS方法。方案前处理简便、有利于节约成本，同时方案线性、准确度、重复性和精密度符合要求，可以用于临床研究曲妥珠药物的定量测定。

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. MKT-28937-1



### 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