

固相萃取结合LC-MS/MS测定血浆中英夫利昔单抗的含量

Determination of Infliximab in Human Plasma by SPE combined with LC-MS/MS

刘丹, 胡凤梅, 黄超, 赵祥龙, 郭立海

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

SCIEX应用支持中心, 中国

SCIEX, China

前言

近年来各种大分子药物在疾病治疗中发挥了重要作用, 全球医药市场对生物药的需求也越来越多。抗体类药物作为生物大分子药物的重要组成部分, 其在临床中的应用也越来越广泛。英夫利昔单抗 (infliximab, IFX) 是一种大分子类单克隆抗体药物, 通过中和TNF- α 的生物学活性而发挥作用, 主要用于一些免疫系统紊乱的自身免疫疾病如克罗恩病、银屑病、类风湿性关节炎等的治疗。

尽管抗体类药物有诸多优点, 但不同患者在接受抗体药物治疗后的反应不尽相同, 为了在最大程度上保证抗体类药物的安全性, 实现个体化给药方案, 临床上需要对抗体类药物进行治疗药物监测 (TDM)。抗体类药物的常规检测方法是免疫学方法, 然而免疫学方法特异性差, 灵敏度较低, 无法实现英夫利昔单抗的精确定量。近些年来液相色谱串联质谱法由于其高选择性、高精度、高精密度的特点, 被广泛应用于大分子研究领域, 尤其是单抗药物的生物分析方法之中。相较于其它已建立的方法, 液相色谱串联质谱方法拥有很多优势。鉴于液相色谱串联质谱在大分子药物生物分析领域的重要作用, 本文介绍了一种基于LC-MS/MS定量测定人体血浆中IFX的方法。

本方法具有以下特点:

- 样本用量较少 (25 μ L)
- 无需免疫富集, 简便经济
- 采用单抗药物作为内标

- 采用胰蛋白酶酶解结合SPE的前处理方法
- 选择性高, 稳定性好

1. 实验部分

1.1. 样品前处理

变性&还原: 取25 μ L标准曲线样品/质控样品/血浆样品, 分别加入内标, 加入盐酸胍及二硫苏糖醇DTT, 涡旋混匀后, 于55 $^{\circ}$ C反应60 min;

烷基化: 还原完成的样本放至室温后加入碘乙酰胺IAM, 避光放置30 min;

酶解: 体系中加入 NH_4HCO_3 , 加入胰蛋白酶, 涡旋混匀, 37 $^{\circ}$ C过夜反应;

终止: 反应完成后加入甲酸终止反应, 混匀待SPE处理;

SPE: 取酶解完成的样品上样至提前活化好的SPE 96孔板上, 上样完成后加入淋洗试剂, 最后加入洗脱剂进行洗脱, 洗脱液稀释后进样分析。

备注: 本实验采用曲妥珠单抗作为内标, 当待测样本存在联合用药情况时可考虑替换为其他单抗类内标或者同位素标记内标。

1.2. 色谱条件

色谱柱为Kinetex F5。流动相采用水 (0.2%甲酸) 和乙腈, 柱温设定为40 $^{\circ}$ C。进样量为10 μ L。洗脱梯度表见表1。

表1. 洗脱梯度

时间 (min)	流速(mL/min)	B(%)
1.20	0.25	18
6.00	0.25	40
6.30	0.25	95
8.00	0.25	95
8.10	0.25	18
10.00	0.25	18

1.3. 质谱条件

采用电喷雾离子源 (Electrospray Ionization, ESI) 和多反应监测 (Multiple Reaction Monitoring, MRM) 模式进行质谱扫描。离子源参数: 加热气 (GS1) 和辅助加热气 (GS2) 分别为55 psi 和50 psi, 脱溶剂气温度为 500°C; 气帘气 (Curtain Gas, CUR) 为 35 psi, 碰撞气 (Collision Gas, CAD) 为9; 喷雾针 (Ionspray, IS) 电压为 5500 V。为了获取较好的稳定性和灵敏度, 各化合物

监测离子对的去簇电压 (Declustering Potential, DP) 和碰撞电压 (Collision Energy, CE), 目标物及内标物监测离子对等参数均经过系统优化, 离子对信息见表2。

表2. 待测组分和内标物质的质谱参数

Q1	Q3	ID	DP/V	CE/V
536.8	902.5	Infliximab1-1	80	28.3
536.8	773.4	Infliximab1-2	80	28.3
536.8	587.3	Infliximab1-3	80	34.3
648.8	1039.5	Infliximab2-1	75	27.8
648.8	876.4	Infliximab2-2	75	30.8
648.8	763.4	Infliximab2-3	75	30.8
545.3	597.3	Trastuzumab-1	80	31.7
363.8	597.3	Trastuzumab-2	80	21.5
415.7	660.3	Trastuzumab-3	80	22.4

2. 结果与讨论

2.1. 回归方程及线性

在本实验条件下, 英夫利昔单抗在0.5~500 µg/mL的范围内标准曲线线性良好, r值大于0.997 (如图1)。

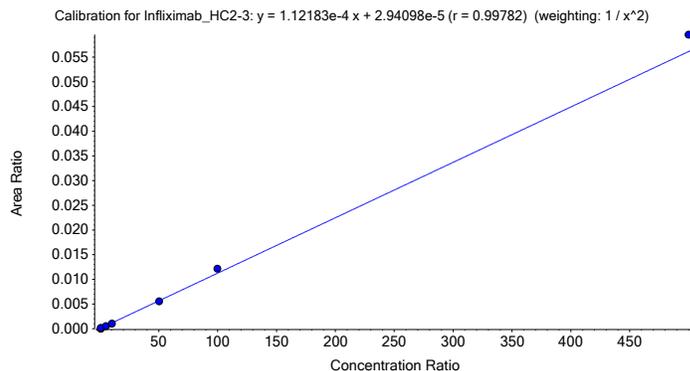


图1. 英夫利昔单抗标准曲线

英夫利昔单抗制备标准曲线上各浓度点的准确度在91.72%~109.76%范围内, 各点准确度偏差小于±15%, 满足定量分析需求 (如图2)。

Sample Name	Sample Type	Component Name	Actual Conc.	Area	Calculated Concentration	Accuracy
DB	Unknown	Infliximab1-2	N/A	N/A	N/A	N/A
BL	Unknown	Infliximab1-2	N/A	N/A	N/A	N/A
IFX-std1	Standard	Infliximab1-2	0.50	3.762e3	0.49	98.51
IFX-std2	Standard	Infliximab1-2	1.00	7.098e3	1.05	105.04
IFX-std3	Standard	Infliximab1-2	5.00	3.454e4	4.59	91.72
IFX-std4	Standard	Infliximab1-2	10.00	6.698e4	9.42	94.24
IFX-std5	Standard	Infliximab1-2	50.00	3.036e5	54.88	109.76
IFX-std6	Standard	Infliximab1-2	100.00	6.521e5	97.30	97.30
IFX-std7	Standard	Infliximab1-2	500.00	3.594e6	517.16	103.43
DB	Unknown	Infliximab1-2	N/A	N/A	N/A	N/A

图2. 英夫利昔单抗标准曲线各浓度点准确度

2.2. 样本采集谱图

血浆制备标准曲线样品中分析物英夫利昔单抗目标肽段和内标曲妥珠单抗目标肽段的色谱图如图3, 待测样品人血浆中英夫利昔单抗目标肽段和内标曲妥珠单抗目标肽段的色谱图如图4, 该方法能将内源性干扰物同目标物完全分离, 色谱信号明显, 色谱峰峰形良好。

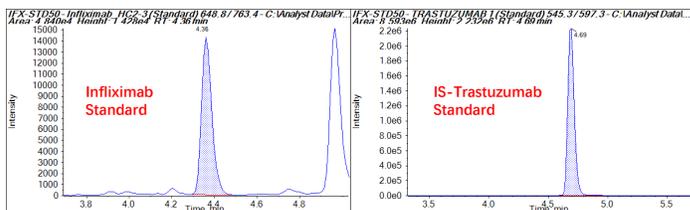


图3. 标准曲线样品中英夫利昔单抗和曲妥珠单抗的色谱图

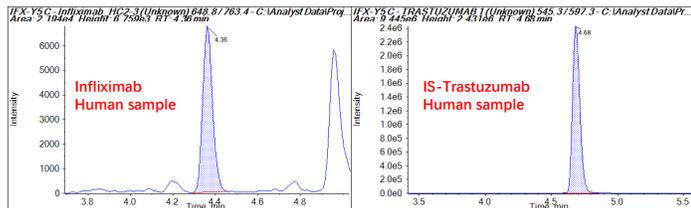


图 4. 血浆样品中英夫利昔单抗和曲妥珠单抗的色谱图

2.3. 方法验证

采用低、中、高三个浓度水平的质控品，每个浓度平行测定3次，根据测定结果计算精密度RSD以及准确度Accuracy；结果表明在本方法下，英夫利昔单抗测试精密度RSD在1.88%~7.31%范围内，添加准确度在89.82%~101.73%（表3），符合方法学分析要求。

表3. 英夫利昔单抗不同浓度质控样品准确度及精密度

质控样本	测定浓度	平均浓度	Accuracy(%)	RSD(%)
LQC	1.41	1.50	100.16	7.31
	1.47			
	1.62			
MQC	20.79	20.35	101.73	1.88
	20.09			
	20.17			
HQC	363.78	359.27	89.82	3.19
	346.23			
	367.78			

总结

本方法基于SCIEX液相色谱串联质谱系统开发，建立了用于英夫利昔单抗准确定量检测的液相色谱串联质谱方法。前处理过程通过还原变性及胰酶酶解等过程，将英夫利昔单抗酶解为特征性肽段，结合SPE过程进行样本净化，很好的排除内源性干扰。同时，基于LC-MS/MS方法的高灵敏度和高特异性的特点，本方法针对特征性肽段的MRM检测，满足了药物浓度监测对英夫利昔单抗监测的灵敏度要求，并且通过方法验证证实方法稳定性好准确性高。本方法的建立有助于更准确的检测血浆中英夫利昔单抗的浓度，可用于临床药物浓度监测的指导和参考。

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-28962-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

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