

血浆中赫赛汀单抗含量的测定

应用及技术服务部

天津博纳艾杰尔科技有限公司, 天津开发区西区南大街179号, 300462

概述

赫赛汀 (注射用曲妥珠单抗), 适应症为转移性乳腺癌: 本品适用于HER2 过度表达的转移性乳腺癌: 作为单一药物治疗已接受过1 个或多个化疗方案的转移性乳腺癌; 与紫杉醇或者多西他赛联合, 用于未接受化疗的转移性乳腺癌患者。赫赛汀单药适用于接受了手术、含蒽环类抗生素辅助化疗和放疗 (如果适用) 后的HER2 过度表达乳腺癌的辅助治疗。

关键词

赫赛汀; 曲妥珠; Luna Omega Polar C18; Peptide-1-MW; LC-MS/MS

化合物信息

表1. 化合物信息

中文名称	英文名称	CAS号	分子式	分子量
赫赛汀	Herceptin	180288-69-1	$C_{6470}H_{10012}N_{1726}O_{2013}S_{42}$	145531.50

实验部分

3.1仪器、试剂与材料

3.1.1主要仪器设备

液相色谱串联质谱仪(AB SCIEX Triple Quad™5500), 配有电喷雾离子源(ESI);
96孔正压装置(Agela Cleanert M96);
氮吹浓缩仪(Agela Cleanert V96)。

3.1.2试剂材料

96孔板: Peptide-1-MW
色谱柱: Luna Omega Polar C18 (2.1×50 mm, 1.6 μm, 100 Å) ; P/N: 00B-4748-AN
实验用水、乙腈、甲酸、碳酸氢铵均为色谱

级; 胰蛋白酶。

3.1.3样品

EDTA抗凝人血浆

3.2样品前处理方法

酶解: 40 μL人血浆加入10 μL 1M碳酸氢铵水溶液并混合均匀, 加入50 μL胰蛋白酶溶液 (1 mg/400 μL) 并混合均匀, 于30 °C条件下过夜酶解。

预处理: 向酶解液加入200 μL 2%氨水水溶液, 涡旋, 待净化;

活化: 96孔板依次使用 200 μL甲醇、200 μL水活化;

上样: 加载预处理后的酶解液至活化后微孔板;

淋洗: 依次使用500 μL水、200 μL水淋洗微孔板;

洗脱: 用100 μL洗脱液 (2%甲酸 乙醇: 水 =3:1) 洗脱2次, 涡旋混合;

氮干复溶: 40 °C氮气干燥后, 加入200 μL 10% 甲醇水溶液涡旋混合, 待检测。

3.3仪器检测条件

3.3.1色谱条件

色谱柱: Luna Omega Polar C18

流动相A相: 0.1%甲酸水溶液;

流动相B相: 0.1%甲酸乙腈溶液;

流速: 0.3 mL/min;

柱温: 40 °C;

进样量: 10 μL;

梯度程序见表2:

表2. 梯度条件

时间 (min)	流速 (mL/min)	B (%)
----------	-------------	-------

0	0.3	10
0.5	0.3	10
2.8	0.3	98
3.6	0.3	98
3.8	0.3	10
6.0	0.3	10

3.3.2 质谱条件

离子源类型：电喷雾离子源（ESI+）

扫描方式：多反应监测正负离子模式（MRM）

喷雾针电压：5500 V

离子源温度：500 °C

加热器（GS1）：60 psi

辅助加热气（GS2）：60 psi

气帘气（CUR）：40 psi

碰撞气（CAD）：9 psi

为获得较好的稳定和灵敏度，各化合物监测离子对的去簇电压（DP）和碰撞电压（CE），目标化合物定量离子对以及内标监测离子对等参数均经过系统优化，优化信息参见表3。本案例参数仅供参考不具备法律效力。

表3. 化合物定性、定量离子和质谱分析参数

特征肽段	Q1	Q3	DP/V	CE/V
FTISADTSK	485.2	721.4	100	23

3.4 结果与讨论

3.4.1 线性范围

配制浓度范围1-100 ug/ml赫赛汀大牛血浆溶液作为样品进行检测并以外标法绘制标准曲线。得到 $y=1.86e+004x+4.5e+004$ ($r=0.9975$) 的线性回归方程，线性良好。

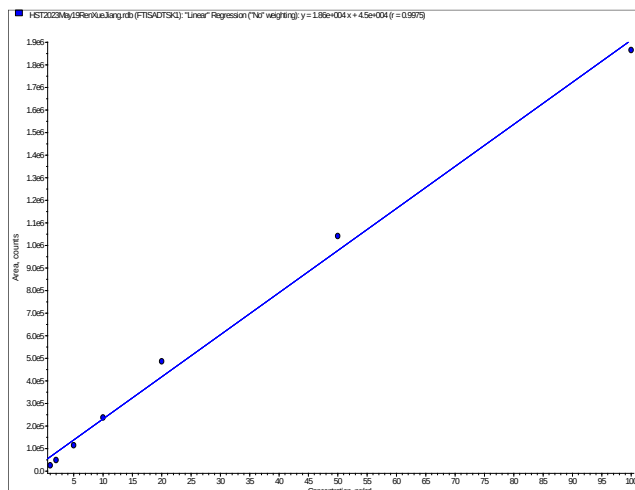


图1. 人血浆基质1-100 ug/mL 线性

3.4.2 方法精密度与准确度

本实验选择10 ug/mL加标平行测定3次，以外标法计算回收率与精密度结果，由表4可知回收率为100%~110%，相对标准偏差RSD小于5%；

表4. 加标回收实验结果

化合物	理论加标浓度 (ug/mL)	检测结果 (ug/mL)	回收率%	RSD%
FTISADTSK	10	10.7	107	2.5
	10	10.3	103	
	10	10.2	102	

3.5 实验谱图

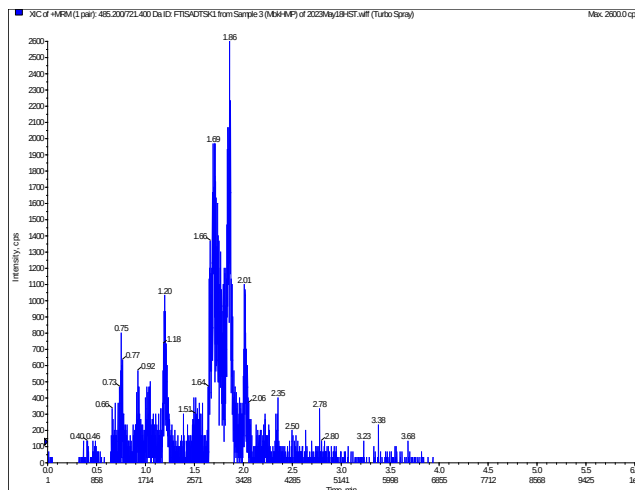


图2. 空白人血浆色谱图

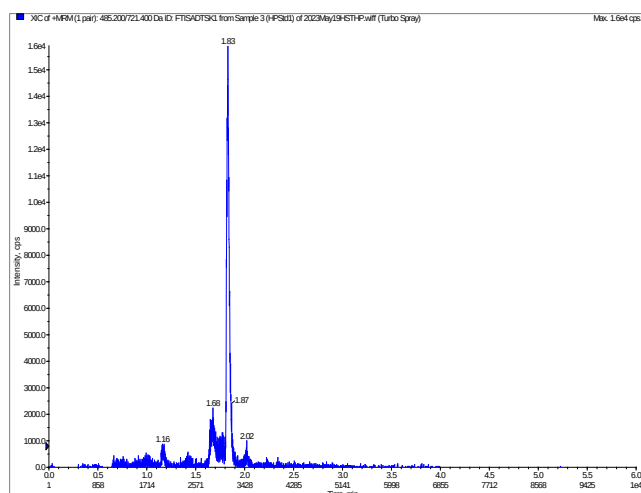


图3. 人血浆1 ug/mL加标色谱图

结论

本文建立了赫赛汀单抗血浆基质的SPE前处理方法，其10 ug/mL外标法添加回收率在103%~110%之间，RSD值均小于5%，能够满足标准检测方法要求。本实验避免了超滤管或磁珠的使用从而极大降低了样本的检测成本。



Xccelerator 加速服务

探索分离，使命加速

Mission to Accelerate Separation

在新药、仿制药研发和科学研究过程中，抢占先机越来越多被大家提及，同时在食品、环境、临床等行业的客户也都面临着项目周期压缩的压力。基于此，我们成立了上海和天津两个方法开发服务中心，为客户加快项目进度提供支持。

Xccelerator 以客户为中心，以色谱技术为中心，为药物研发和科学研究提供全方位加速服务。

附：相关产品

产品名称	规格描述	包装数量	订货号
色谱柱	1.6 μ m, 2.1 $\times$ 50 mm	1/PK	00B-4748-AN
SPE板	5mg	2/PK	Peptide-1-MW
保护柱卡套	Security Guard Kit	1/PK	AJ0-9000
保护柱柱芯	4 $\times$ 3.0 mm	10/PK	AJ0-9505

三大研发中心

中国天津

地址：天津市开发区西区南大街179号

电话：400-606-8099

邮箱：cninfo@phenomenex.com

中国上海

地址：上海市长宁区福泉北路518号1号楼1层

电话：400-606-8099

邮箱：cninfo@phenomenex.com

美国总部

地址：411 Madrid Avenue Torrance, CA 90501-1430, USA

Tel: +1 (310) 212-0555

Fax: +1 (310) 328-7768

Email: cninfo@phenomenex.com

仅用于研究目的，不可用于临床诊断程序。

© 2022 天津博纳艾杰尔科技有限公司保留所有权利。



如果您对于本方法的执行有任何问题，或想要了解更多信息，请拨打400-606-8099 联系我们的技术专家，我们很乐意为您提供帮助！

Confidential - Company Proprietary

