

# Application News

## No. C169

### nSMOL™ Antibody BA Kit

## 使用 Fab 选择性蛋白水解法 nSMOL 法对抗体药物的 LC-MS 生物分析 — 5 — 设备精密度和准确性的比较 —

### ■ nSMOL™ Antibody BA Kit 的特性

本公司的 nSMOL 法是一种全新的划时代的 LCMS 预处理法，能够对单克隆抗体的 Fab 区域进行选择性的蛋白水解。它使方法开发独立于抗体药物的种类，不受药物种类的限制抗体药物生物分析的模式带来了转变。

nSMOL 蛋白水解是唯一一种符合日本厚生劳动省颁布的《药物开发中生物样品中药物浓度分析法验证指南》中关于多种抗体药物的标准方法。本公司为此提供了多种的优化方法和方案。本公司生产的三重四极杆质谱仪 LCMS™-8050 (以下简称 LCMS-8050) 和 LCMS™-8060 (以下简称 LCMS-8060) 对该方法进行优化。

### ■ 本公司的 LCMS-8050 与 A 公司 LC-MS 的比较

本次，我们使用本公司的 LCMS-8050 与 A 公司的混合型质谱仪 LC-MS 分析了贝伐单抗，比较了两者的准确度和灵敏度。两设备均采用 nSMOL 法进行了预处理。MRM 方法中的采集时间和循环时间如表 1 所示。

表 1 LCMS-8050 与 A 社 LC-MS 的 MRM 数据采集时间

装置	Dwell Time	Pause Time	Cycle Time (最大)
LCMS-8050	10 msec	3 msec	182 msec
A 社 LC-MS	15 msec	5 msec	280 msec

### ■ 使用 nSMOL 法测定贝伐单抗的分析条件

#### 【样品处理方案】

nSMOL 法能够以相同的样品处理方案处理所有抗体药物。

使用孔径为 100nm 的 IgG 回收树脂将血浆中的所有 IgG 固定于树脂的细孔中。对血浆中除 IgG 外的多余成分进行滤除和清洗后，添加胰蛋白酶结合的微纳米粒子 (FG 珠、直径 200nm)，进行蛋白质水解。反应后加入终止反应的试剂，用旋转过滤器除去树脂和 FG 珠，之后便可直接用于 LC-MS 分析。定量肽的 MRM 条件如表 2 所示，分析条件如表 3 所示。

表 2 贝伐单抗的定量肽段和内标离子对

肽	MRM Transition	目的
P14R	512.1>292.3 (b3+)	定量用 (IS) 删除 结构确认用 结构确认用
	512.1>389.3 (b4+)	
	312.1>660.4 (b6+)	
FTFSLDTSK	523.3>797.4 (y7+)	定量用 结构确认用 结构确认用
	523.3>898.5 (y8+)	
	523.3>650.3 (y6+)	
※ 人体血浆中的定量范围		: 0.146~300 µg/mL
平均准确度		: 100.7%

表 3 分析条件

#### [LC] Nexera™X2 System

Column	: Shim-pack™ GISS C18 (50 mm × 2.1 mm, 1.9 µm)
Column temp.	: 50 °C
Solvent A	: 0.1 % formic acid/water
Solvent B	: 0.1 % formic acid/acetonitrile
Gradient	: B conc. 1% (1.5 min) / 1-35 % (3.5 min) / 95 % (1 min) / 1 % (1 min)
Flow rate	: 0.4 mL/min (5 min)
Injection volume	: 10 µL

#### [MS] LCMS-8050

Ionization	: ESI Positive
DL temp.	: 250 °C
Block Heater temp.	: 400 °C
Interface temp.	: 300 °C
Nebulizer gas flow	: 3 L/min
Drying gas flow	: 10 L/min
Heating gas flow	: 10 L/min
Probe position	: 2 mm

## ■ 考察和结论

nSMOL 法能够以高精度对人体血浆中的贝伐单抗进行定量, 验证中的准确度和精确度满足了小分子药品的指南标准。对使用本公司的 LCMS-8050 与 A 公司的混合型质谱仪 LC-MS 分析贝伐单抗的结果进行比较后, 发现本公司产品比 A 公司 LC-MS 具有更高的准确度和灵敏度, 且能够更加稳定地测定内标物 P14R

的面积值(表 4)。本公司的 LCMS-8050 在低浓度下也能采集稳定的数据。我们认为之所以能得更佳的精密度和准确性, 可能是因为裂解气体的种类以及质谱仪的结构差异。

表 4 LCMS-8050 与 A 公司 LC-MS 对贝伐单抗分析结果的比较

设定浓度 ( $\mu\text{g/mL}$ )	LCMS-8050				A 社三重四极杆型 LC-MS			
	峰面积值	浓度 ( $\mu\text{g/mL}$ )	准确度 %	P14R 面积值	峰面积值	浓度 ( $\mu\text{g/mL}$ )	准确度 %	P14R 面积值
0	445			640103	2185	< 0	N/A	382317
0.25	6436	0.257	102.8	610062	6502	0.217	84.7	416950
0.512	10358	0.485	94.8	623157	4166	0.537	104.9	150679
1.02	18712	1.04	101.8	597366	18452	1.00	98.2	408900
2.56	45959	2.63	102.9	623257	43997	2.66	103.7	409648
6.4	108651	6.57	102.6	609288	83687	6.85	107.1	315272
16	265218	15.6	97.3	634878	250600	16.6	103.7	396643
40	638375	38.7	96.8	617491	619589	38.9	97.3	420638
100	1662475	102	102.5	609322	1583550	105	105.2	399268
250	3927201	250	100.1	590061	3798713	253	101.3	398236
平均 %RSD				615499 0.024				369855 0.212

## ■ IgG 的高特异性 / 简单的设备维护

使用 nSMOL 法能够选择性地收集目标肽进行测定, 并能将分析样品的污染控制在最低限度。因此, 能够避免使用 LC-MS 进行生物分析时因基质效应所导致的分析精确度和重现性、回收率降低的问题, 并有助于提升 LC-MS 的连续分析持久性。

并且, 本公司包括 LCMS-8050 在内的三重四极杆型 LCMS 无需任何工具便可更换 ESI 毛细管, 并能够在不解真空的情况下更换 DL 管, 因此能够缩短停机时间。相较于其他公司竞品, 更换零部件的成本也更低。

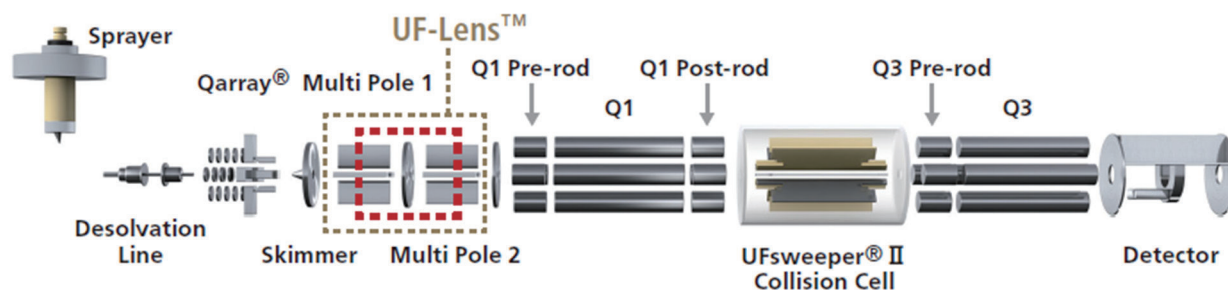


图 1 LCMS-8050、LCMS-8060 的结构

### 【参考文献】

Iwamoto N *et al.*, *Analyst*, DOI: 10.1039/c3an02104a  
Iwamoto N *et al.*, *Drug Metab Pharmacokin*, DOI: 10.1016/j.dmpk.2015.11.004

### 【开发负责人】

全球应用开发中心 前岛 希  
 基板技术研究所 岩本 典子、岛田 崇史

本文件中记载的产品尚未作为医疗器械得到医药品医疗器械法的批准。  
 无法以治疗诊断为目的, 无法通过正常程序使用。

nSMOL、LCMS、Nexera、Shim-pack、UF-Lens、Qarray 以及 UFsweeper 是岛津制作所株式会社的商标。  
 本文中记载的公司名称、产品名称、服务标志和 Logo 是各个公司的商标和注册商标。  
 此外, 本文中可能对“TM”和“®”进行了省略。



岛津企业管理(中国)有限公司  
 岛津(香港)有限公司

<http://www.shimadzu.com.cn>

用户服务热线电话: 800-810-0439  
 400-650-0439

### 免责声明:

\* 本资料未经许可不得擅自修改、转载、销售;  
 \* 本资料中的所有信息仅供参考, 不予任何保证。  
 如有变动, 恕不另行通知。

第一版发行日: 2018 年 4 月