

超高效液相色谱测定蛋白类药物中的唾液酸含量

LC-467

摘要：本文建立了一种使用带荧光检测器的超高效液相色谱 Nexera LC-40X3 检测蛋白类药物中唾液酸含量的分析方法。蛋白类药物经超滤脱盐，再经醋酸水解释放唾液酸，然后以 DMB 衍生标记后上机测定。采用外标法定量，Neu5Gc 和 Neu5Ac 在 0.02~400 $\mu\text{mol/L}$ 浓度范围内线性良好，相关系数大于 0.9999，回读值准确度在 95.5~111.3% 之间。三个浓度下保留时间和峰面积的相对标准偏差（RSD）分别在 0.09~0.13% 和 0.19~2.26% 之间。Neu5Gc 和 Neu5Ac 的检出限分别为 0.0027 $\mu\text{mol/L}$ 、0.0030 $\mu\text{mol/L}$ ，定量限分别为 0.0092 $\mu\text{mol/L}$ 、0.0098 $\mu\text{mol/L}$ ；三个浓度下样品加标回收率在 95.4~107.3% 之间。可为蛋白类药物中唾液酸含量测定提供参考。

关键词：超高效液相色谱 唾液酸 蛋白类药物 单抗

技术特点：

- ❖ 方法线性范围为 0.02~400 $\mu\text{mol/L}$ ，优于药典公示稿中的 0.04~40 $\mu\text{mol/L}$ ；
- ❖ 荧光检测器 RF-20AXS 灵敏度高，Neu5Gc 和 Neu5Ac 的定量限可达 0.0092 $\mu\text{mol/L}$ 和 0.0098 $\mu\text{mol/L}$ 。

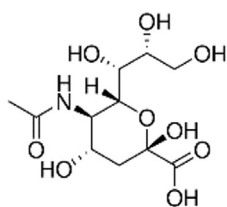
唾液酸 (Sialic acid, SA) 是一个由九碳酮基酸性单糖及其衍生物组成的大家族。在生物制药常用的哺乳动物表达系统中，主要以 N-乙酰神经氨酸 (Neu5Ac) 和 N-羟乙酰神经氨酸 (Neu5Gc) 两种类型为主。

唾液酸化是蛋白类药物重要的糖基化修饰，与药物的稳定性和半衰期、安全性和生物活性息息相关，是蛋白类药物的关键质量属性，需要在生产过程中加以监控。

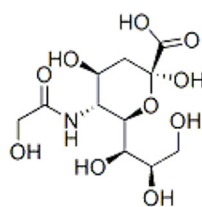
唾液酸通常以 α -糖苷键的形式连在蛋白糖链的末端，故需要先通过温和酸水解将其从蛋白分子中释

放出来。又由于唾液酸本身不具有荧光，但其在酸性条件下能与 4,5-亚甲二氧基-1,2-邻苯二胺盐 (DMB) 经衍生反应生成 DMB 衍生物，该衍生物能产生荧光信号，从而被荧光检测器检测到。

本文参考国家药典委发布的“通则 3102 唾液酸测定法”公示稿，建立了一种使用带荧光检测器的超高效液相色谱 Nexera LC-40X3 检测蛋白类药物中唾液酸含量的分析方法。蛋白类药物经超滤脱盐，再经醋酸水解释放唾液酸，然后以 DMB 衍生标记后上机测定。方法线性范围宽、灵敏度高、重复性好、准确可靠，供相关检测人员参考。



Neu5Ac 结构式



Neu5Gc 结构式

■ 实验部分

1.1 仪器

岛津超高效液相色谱仪 Nexera LC-40 X3。具体配置为：

■ 结果与讨论

2.1 对照品溶液色谱图

10 $\mu\text{mol/L}$ 对照品溶液与空白溶液的重叠色谱图如下所示。Neu5Gc 和 Neu5Ac 峰形良好，分离度大于 5。空白溶液不干扰测定。

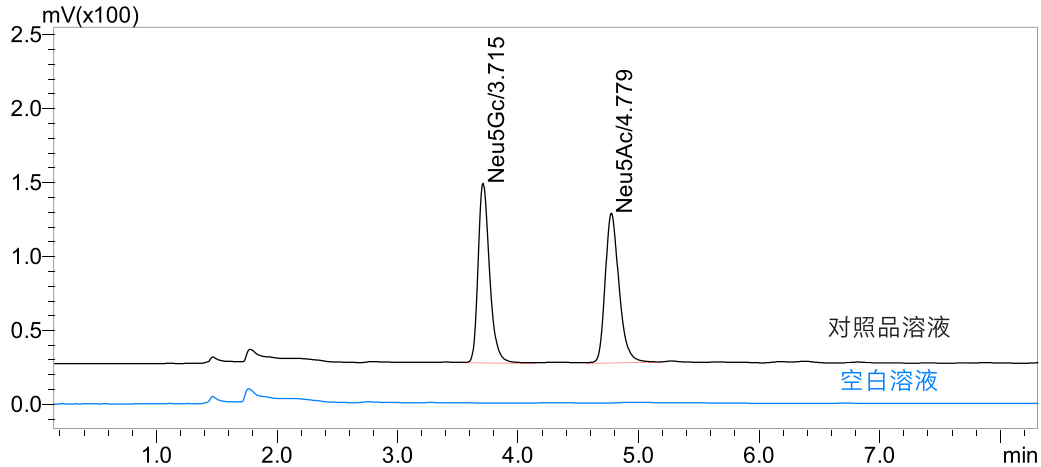


图 1 对照品溶液色谱图 (10 $\mu\text{mol/L}$)

2.2 线性关系和灵敏度

按照 1.3 制备十二个对照品溶液，按 1.2 中的分析条件进行测定，以浓度为横坐标，峰面积为纵坐标，外标法绘制校准曲线。校准曲线见图 2，线性关系、检出限和定量限见表 2。Neu5Gc 和 Neu5Ac 在 0.02~400 $\mu\text{mol/L}$ 范围内，相关系数大于 0.9999，回读值准确度在 95.5~111.3% 之间，线性良好。使用 LabSolutions 软件，根据信噪比计算检出限 ($S/N=3$) 和定量限 ($S/N=10$)，Neu5Gc 和 Neu5Ac 的检出限分别为 0.0027 $\mu\text{mol/L}$ 、0.0030 $\mu\text{mol/L}$ ，定量限分别为 0.0092 $\mu\text{mol/L}$ 、0.0098 $\mu\text{mol/L}$ ，灵敏度高。

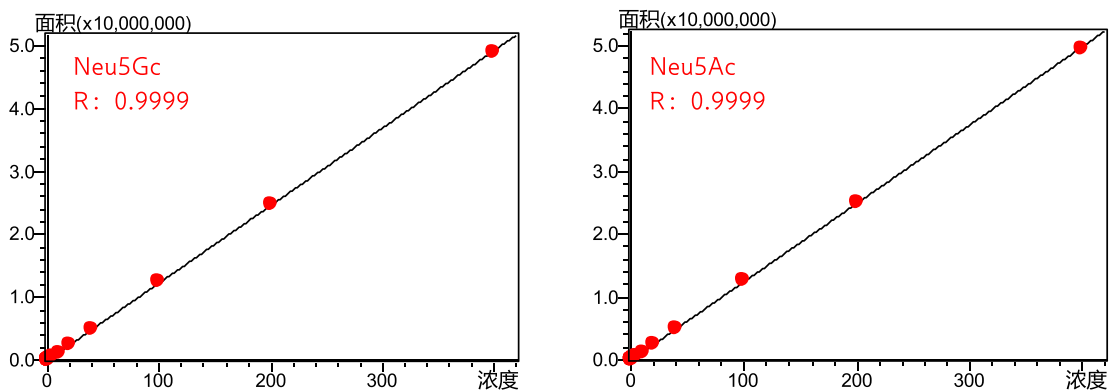


图 2 校准曲线图

表 2 线性关系、检出限和定量限 (权重: 1/C)

名称	浓度范围 ($\mu\text{mol/L}$)	回读值准确度 (%)	相关系数 r	检出限 ($\mu\text{mol/L}$)	定量限 ($\mu\text{mol/L}$)
Neu5Gc	0.02~400	95.8~111.3	0.9999	0.0027	0.0092
Neu5Ac	0.02~400	95.5~109.5	0.9999	0.0030	0.0098

2.3 精密度

对照品溶液连续 6 次进样，考察仪器的精密度，结果如表 3 所示。三个不同浓度下，Neu5Gc 和 Neu5Ac 保留时间和峰面积的 RSD 分别在 0.09~0.13% 和 0.19~2.26% 之间，仪器精密度良好。

表 3 精密度结果 (n=6)

名称	RSD% (0.04 μmol/L)		RSD% (10 μmol/L)		RSD% (400 μmol/L)	
	R.T.	Area	R.T.	Area	R.T.	Area
Neu5Gc	0.09	2.26	0.11	0.31	0.12	0.28
Neu5Ac	0.10	1.89	0.11	0.20	0.13	0.19

2.4 加标回收实验

按照 1.3 对单抗注射液 1 (10 mg/mL) 进行处理，在供试品溶液中添加唾液酸标准品，制成三个不同浓度的加标样品，再经酸解和衍生后进行测定。加标回收结果见表 4。三个不同浓度下，Neu5Gc 和 Neu5Ac 的加标回收率在 95.4~107.3% 之间，结果准确可靠。

表 4 加标回收结果

名称	供试品溶液测定值 (μmol/L)	回收率 / %		
		0.2 μmol/L	10 μmol/L	400 μmol/L
Neu5Gc	<LOQ*	105.5	100.6	95.4
Neu5Ac	1.912	95.5	107.3	100.5

*: 表示低于定量限

2.5 实际样品分析

使用本方法对 5 种蛋白类药物进行分析，典型色谱图见图 3。按照“通则 3102 唾液酸测定法”中的规定计算唾液酸含量，结果见表 5。

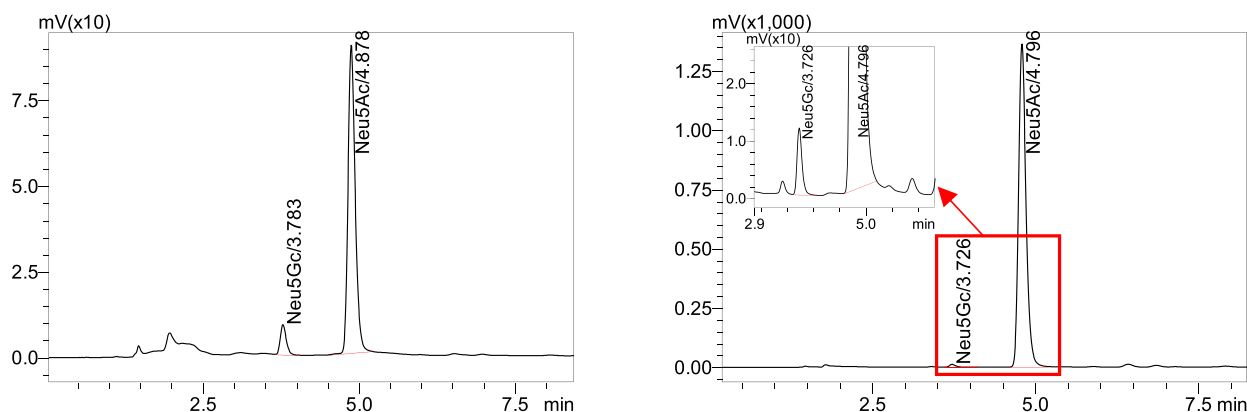


图 3 样品典型色谱图 (左: 单抗注射液 4; 右: 融合蛋白注射液)

表 5 样品分析结果

No.	名称	蛋白浓度 (mg/mL)	供试品溶液中蛋白浓度 (mg/mL)	Neu5Gc 含量 (mol/mol 蛋白)	Neu5Ac 含量 (mol/mol 蛋白)
1	单抗注射液 1	10	10	<LOQ*	0.029
2	单抗注射液 2	75	25.4	0.002	0.040

3	单抗注射液 3	150	10	0.002	0.029
4	单抗注射液 4	22	32	0.003	0.042
5	融合蛋白注射液	10	1	0.110	16.155

*: 表示低于定量限

■ 结论

本文参考国家药典委发布的“通则 3102 唾液酸测定法”公示稿，建立了一种使用带荧光检测器的超高效液相色谱 Nexera LC-40 X3 检测蛋白类药物中唾液酸含量的分析方法。蛋白类药物经超滤脱盐后，再经醋酸水解释放唾液酸，然后以 DMB 衍生标记后上机测定。方法线性范围宽、灵敏度高、重复性好、准确可靠，适用于蛋白类药物中唾液酸含量测定。

岛津应用云

