

利用岛津高效液相色谱与单四极杆质谱联用系统对曲妥珠单抗进行肽图分析

LCMS-027

摘要： 本文采用岛津 Nexera LC-40 高效液相色谱仪及单四极杆质谱 LCMS-2020 联用对曲妥珠单抗的胰蛋白酶酶解样品进行分析，配套使用多肽分析专用色谱柱进行分离，利用紫外检测器和质谱进行检测，质谱检测结果对关键色谱峰进行定位。该方法重复性实验中，各肽段的保留时间 RSD 为 0.04-0.22%；峰面积 RSD 值为 0.46-1.88%。实验结果表明，该方法方便快捷，具有良好的重复性。

关键词： Nexera LC-40 LCMS-2020 曲妥珠单抗 肽图

曲妥珠单抗(Trastuzumab),是抗 ErbB2/HER2(原癌基因人类表皮生长因子 2) 的单克隆抗体类生物药,为重组人源化单克隆抗体。曲妥珠单抗被广泛应用于各期 HER-2 阳性乳腺癌的治疗,于 1998 年被美国 FDA 批准,是第一个抗 HER-2 的人源化单克隆抗体。

随着科技发展与国家政策扶持,生物药因具有相比其他药品安全性高、毒性小、营养价值高等特点而不断繁荣起来,而日益严格的各项法规要求让我们对生物药结构研究、特性分析与质量控制也有了更高的要求。

HPLC 肽图分析是蛋白类生物药一级结构研究中极为重要的手段之一,不但可以比较生物类似药与原

研药一级结构的一致性,确认基因工程上游和下游处理过程中是否发生差错、重组产物中是否存在翻译后修饰及未预期氨基酸的变异等,而且不同批次产品的肽谱比较可验证工艺过程的稳定性。因此,肽谱分析在生物技术药物质控中尤为重要。

本实验以曲妥珠单抗为例,使用高效液相色谱仪 Nexera LC-40 与单四极杆质谱仪 LCMS-2020 联用系统对曲妥珠单抗肽图进行分析(通过质谱图辅助定性),实验结果表明 Nexera LC-40 高效液相色谱系统在进行肽图分析实验时重复性良好,可用于日常蛋白类生物药质控中的肽图分析检测项目。

■ 实验部分

1.1 仪器

高效液相色谱系统 Nexera LC-40 与单四极杆质谱仪 LCMS-2020 联用系统,配置信息如下:

系统控制器: SCL-40A

自动进样器: SIL-40C XR

输液泵: LC-40B XR

柱温箱: CTO-40C

脱气机: DGU-405

质谱仪: LCMS-2020

检测器: SPD-M40A

色谱工作站: Labsolutions Ver. 5.99

1.2 分析条件

液相条件

色谱柱: Shim-pack GISS-HP C18 (100 mm × 2.1 mm I.D., 3.0 μm, 岛津(上海)实验器材有限公司岛津, P/N: 227-30084-02,)

流动相: A, 0.1% 甲酸水溶液; B, 0.1% 甲酸乙腈溶液

流速: 0.4 mL/min

柱温: 50°C

进样体积: 10 μL

检测波长: 214 nm, 280 nm

洗脱方式: 梯度洗脱, B 相起始浓度为 3%, 时间程序如表 1 所示。

表 1 梯度洗脱时间程序

时间 (min)	单元	处理命令	值
2.00	泵	B Conc	3
50.00	泵	B Conc	50
51.00	泵	B Conc	90
56.00	泵	B Conc	90
56.10	泵	B Conc	3
60.00	控制器	Stop	

质谱条件

分析仪器: LCMS-2020

加热块温度: 400°C

雾化气流速: 3.0 L/min

接口电压: 4.5 kV

离子化模式: ESI+

DL 温度: 250°C

干燥气流速: 10.0 L/min

扫描模式: scan

■ 样品前处理

供试品溶液制备: 吸取 5 μ L 2.0 mg/mL 的曲妥珠单抗水溶液于 1.5 mL 的离心管中, 加 80 μ L 还原溶液 (50 mM Tris-HCl, 含 8 M 尿素和 5 mM DTT (二硫苏糖醇)), 在 37°C 下震荡 60 min, 结束后加入 4 μ L IAA (碘乙酰胺) 溶液 (500 mM), 在室温条件下避光震荡 30 min, 然后加入 600 μ L 酶解缓冲液 (50 mM Tris-HCl) 和 5 μ L 胰蛋白酶溶液 (含 1 μ g 胰蛋白酶), 在 37°C 下反应 4 h, 酶解结束后加入 10 μ L 50% 甲酸水溶液终止酶解反应, 然后转入低吸附 PP 材质的样品小瓶上机分析。

■ 结果与讨论

3.1 曲妥珠单抗酶解液色谱图

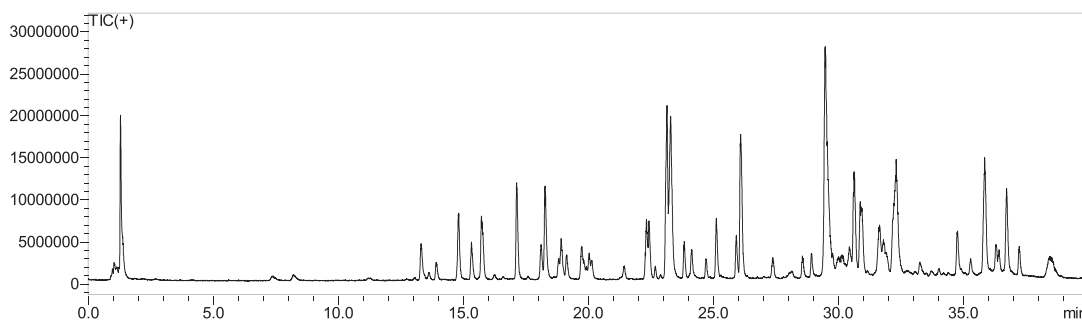


图 1 曲妥珠单抗酶解液 TIC 图

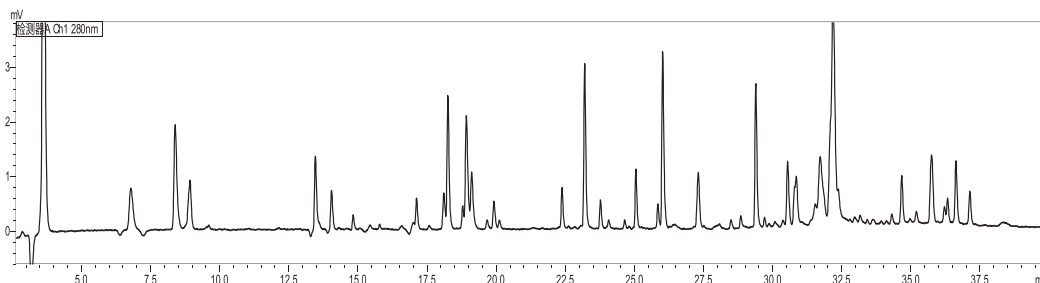


图 2 曲妥珠单抗酶解液在 280 nm 处的色谱图

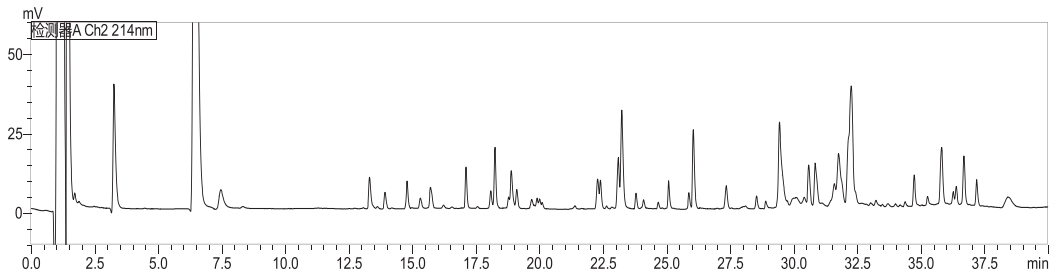


图3 曲妥珠单抗酶解液在 214 nm 处的色谱图

3.2 重复性实验

按照 1.2 分析条件测定，将处理后的曲妥珠单抗酶解液连续进样测定 6 次（图 4 和 5）。通过质谱结果对各峰进行定位，部分肽段序列信息及其保留时间请见表 2。液相色谱图各峰的保留时间 RSD 值为 0.04-0.22%；峰面积 RSD 值为 0.46-1.88%，结果见表 2 所示。实验结果表明，Nexera LC-40 系统在进行肽图分析是具有良好的精密度。

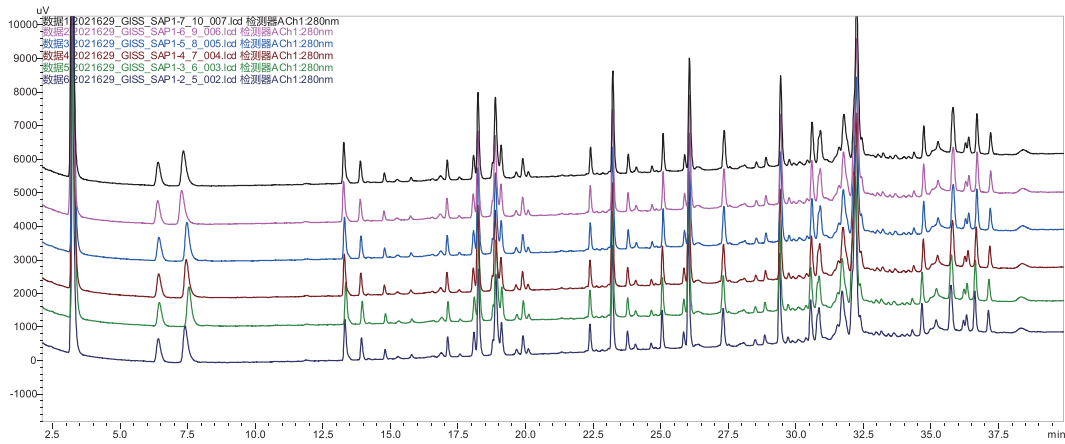


图4 波长 280 nm 处重复性色谱图

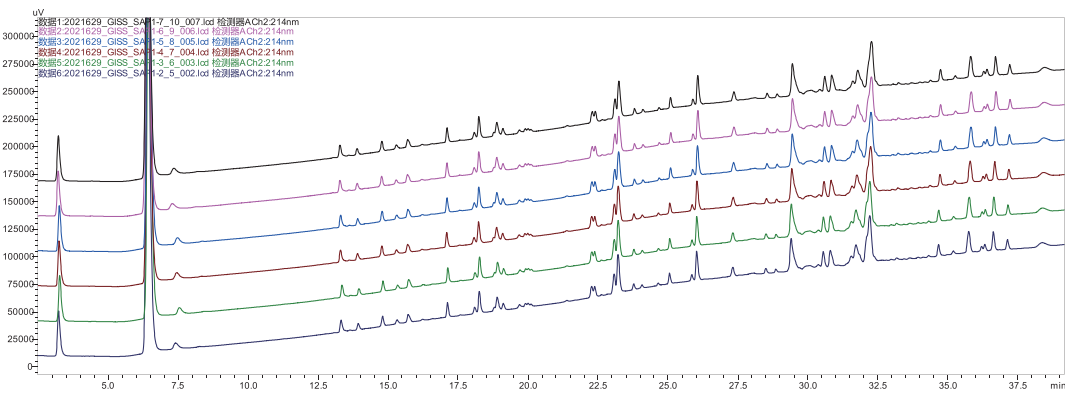


图5 波长 214 nm 处重复性色谱图

表 2 部分肽段保留时间及峰面积 RSD 汇总

Peak	对应肽段	平均保留时间 (min)	RSD% (保留时间)	平均峰面积	RSD% (峰面积)
Peak 1	LLIYSASFLYSGVPSR.light	13.320	0.22	7645	0.50
Peak 2	LSC[+57.021464]AASGFNIK.light	18.098	0.08	3987	0.62
Peak 3	ASQDVNTAWAWYQQKPGK.light	18.905	0.07	18506	0.49
Peak 4	DIQMTQSPSSLSASVGDR.light	19.917	0.05	3073	0.83
Peak 5	DIQMTQSPSSLSASVGDRV TITC[+57.021464]R.light	23.232	0.04	16219	1.88
Peak 6	TTPPVLDSDGSFFLYSK.light	27.349	0.06	6915	0.62
Peak 7	SGTASVVC[+57.021464]LLNNFYPR.light	32.237	0.08	44544	0.51
Peak 8	ALPAPIEK.light	15.725	0.10	47343	0.46

■ 结论

本实验使用岛津高效液相色谱仪 Nexera LC-40 与单四极杆质谱仪 LCMS-2020 联用系统对曲妥珠单抗酶解液进行分析，重复性实验中，色谱图各峰保留时间 RSD 值为 0.04-0.22%；峰面积 RSD 值为 0.46-1.88%，仪器重复性良好。实验结果表明岛津 Nexera LC-40 高效液相色谱仪分析速度快、稳定性良好，适用于制药药检相关行业对生物药质量控制和分析的检验检测工作，能为生物药的质量控制检测项目（肽图分析）提供一个经济高效且简便的解决方案。

岛津应用云

