

超高效液相色谱三重四极杆质谱联用法 用于抗体中唾液酸的测定

LCMSMS-351

摘要：建立了岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 和三重四极杆质谱仪 LCMS-8060 联用测定抗体中唾液酸 N-乙酰神经氨酸 (Neu5Ac) 和 N-羟乙酰神经氨酸 (Neu5Gc) 含量的分析方法。利用三氟乙酸水解释放出抗体中的唾液酸，以 InertsilAmide 酰胺基色谱柱对唾液酸进行保留和分离，采用 LCMS-8060 在 ESI 负离子模式下 7 min 内完成定量分析。本文考察了方法的选择性、线性关系、重复性与准确度及残留，结果表明：空白溶剂及内标化合物对唾液酸定量分析无明显影响；Neu5Ac 与 Neu5Gc 分别在 0.02~20 $\mu\text{mol/L}$ 和 0.008~8 $\mu\text{mol/L}$ 浓度范围内线性关系良好，线性相关系数均大于 0.999，准确度范围分别在 93.4%~111.6% 和 96.7%~102.8% 之间；低中高三个不同浓度的质控品平行测定 6 次，Neu5Ac 和 Neu5Gc 测定结果的 RSD 分别为 1.45%~2.91% 和 0.78%~5.35%，结果均值的准确度分别为 86.5%~94.9% 和 91.7%~101.8%，重复性和准确度良好；空白样品无明显残留，不影响样品中唾液酸的定量测定。该方法具有前处理简单、分析快速、选择性强、重复性好和灵敏度高的特点，可用于抗体类药物中唾液酸含量的分析。

关键词：唾液酸 抗体超高效液相色谱 三重四极杆质谱仪

近年来，单克隆抗体作为治疗性抗体在生物制药领域发展得越来越快，主要应用于恶性肿瘤、自身免疫性疾病、病毒感染、中枢神经紊乱等治疗领域。单克隆抗体是一类以免疫球蛋白 G 的结构为基础的大分子蛋白质类药物，它具有复杂的结构特征，主要由 Fab 和 Fc 两大功能区组成，在 Fab 或 Fc 特定的位点存在糖基化修饰。糖基化修饰是评价抗体的关键质量属性之一，它不仅对维持单抗的结构有重要作用，且一些特定的糖基化修饰类型及不同的糖基化修饰程度会对抗体的安全性特征产生影响，如核心岩藻糖基化、半乳糖基化、唾液酸化、甘露糖基化等。

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。目前，唾液酸家族成员已经超过 50 个化合物，但在生物制药领域应用的哺乳动物表达系统中主要存在两种类型的唾液酸，分别是 N-乙酰神经氨酸 Neu5Ac、和 N-羟乙酰神经氨酸 Neu5Gc。有研究表明 Fc

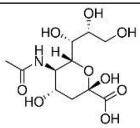
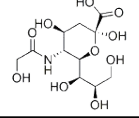
段唾液酸含量越高，与 FcRs 的结合活性就越低，从而导致抗体依赖细胞毒性 (ADCC) 降低，其与细胞表面抗原的结合活性也随之降低，因此生物药生产过程中需要密切监测唾液酸。

目前，测定唾液酸的方法主要有高效液相色谱法、分光光度法、气相色谱法、毛细管区带电泳法等。一般高效液相色谱法和气相色谱法前处理需要对唾液酸样品进行衍生化。衍生试剂的加入增加了分离的难度且前处理时间较长；分光光度法和毛细管区带电泳法灵敏度欠佳，检出限较高。因此本文建立超高效液相色谱串联质谱测定唾液酸的方法，采用 Inertsil Amide 酰胺基色谱柱对强极性唾液酸进行了较好的保留，并能有效地分离抗体样品中的干扰成分，以 ESI 负离子模式测定唾液酸，可得到较好灵敏度。该方法具有前处理简单、分析快速、选择性强、灵敏度高的特点，供生物制药领域相关人员参考。

实验部分

1.1 化合物信息

表1 化合物信息

化合物名称	英文名	CAS No.	分子式	结构式
N-乙酰神经氨酸	N-acetylneuraminic acid	131-48-6	C ₁₁ H ₁₉ NO ₉	
N-羟乙酰神经氨酸	N-Glycolylneuraminic acid	1113-83-3	C ₁₁ H ₁₉ NO ₁₀	

1.2 仪器

本实验使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 与三重四极杆质谱仪 LCMS-8060 联用系统。具体配置为 LC-30AD×2 输液泵, DGU-20A_{SR} 在线脱气机, SIL-30ACMP 自动进样器, CTO-20AC 柱温箱, FCV-14AH 柱后切换阀, CBM-20A 系统控制器, LCMS-8060 三重四极杆质谱仪, LabSolutions Ver. 5.91 色谱工作站。

1.3 分析条件

液相条件

色谱柱: Inertsil Amide(2.1 mm I.D.×100 mm L.,
5 μm)

柱温: 40℃

进样量: 5 μL

流动相: A 相 -0.2% 甲酸水
B 相 -0.2% 甲酸乙腈

洗脱方式: 梯度洗脱, B 相初始浓度为 80%,
洗脱程序见表 2

流速: 0.4 mL/min

1.5 min 前和 3.5 min 后的样品溶液切阀至废液

表2 梯度洗脱程序

Time(min)	Module	Command	Value
3.50	Pumps	Pump B Conc.	50
4.50	Pumps	Pump B Conc.	50
4.51	Pumps	Pump B Conc.	80
7.00	Controller	Stop	

质谱条件

分析仪器: LCMS-8060

接口温度: 300℃

离子化模式: ESI(-)

DL 温度: 250℃

离子源接口电压: -1.5 kV

加热模块温度: 400℃

雾化气: 氮气 3.0 L/min

扫描模式: 多反应监测 (MRM)

加热气: 空气 15.0 L/min

驻留时间: 60 ms

干燥气: 氮气 5.0 L/min

延迟时间: 3 ms

碰撞气: 氩气

MRM 参数: 见表 3

表3 MRM优化参数

化合物	前体离子	产物离子	Q1 Pre Bias (V)	CE (V)	Q3 Pre Bias (V)
Neu5Ac	308.15	87.00*	11.0	20.0	14.0
		170.20	11.0	14.0	16.0
Neu5Gc	324.00	116.05*	16.0	15.0	11.0
		87.00	12.0	21.0	17.0
谷氨酰胺 (IS)	145.15	127.10	10.0	15.0	23.0

注：*表示定量离子

1.4 标准品与试剂

N-乙酰神经氨酸、N-羟乙酰神经氨酸、谷氨酰胺标准品及乙腈均购自 Sigma 公司；实验用水由 Milli-Q 水净化系统 (Millipore, Ltd.) 制得；其余试剂均为分析纯。

1.5 标准溶液的配制

内标溶液配制：精密称取谷氨酰胺标准品适量，用水溶解并稀释至 3 mmol/L 的溶液。

取 N-乙酰神经氨酸与 N-羟乙酰神经氨酸标准品各适量，用水溶解配制成含 100 μmol/L Neu5Ac、40 μmol/L Neu5Gc 的标准储备液。取标准储备液适量，用水逐级稀释配制 7 个标准曲线点，Neu5Ac 浓度分别为 0.02 μmol/L、0.05 μmol/L、0.5 μmol/L、1 μmol/L、5 μmol/L、10 μmol/L、20 μmol/L，Neu5Gc 浓度分别为 0.008 μmol/L、0.02 μmol/L、0.2 μmol/L、0.4 μmol/L、2 μmol/L、4 μmol/L、8 μmol/L。

1.6 样品前处理

单抗样品：精确移取适量，用超纯水稀释 10 倍。

分别取上述稀释好的样品溶液和标准曲线溶液各适量，加入等体积的 0.1 mol/L 三氟乙酸溶液，加 5 μL 谷氨酰胺内标溶液，80℃下进行酸解。酸解后加入 2 倍体积的乙腈，涡旋混匀，13000 rpm 离心 10 min，取上清液进行色谱分析。

结果与讨论

2.1 标准样品一级质谱图与产物离子扫描质谱图

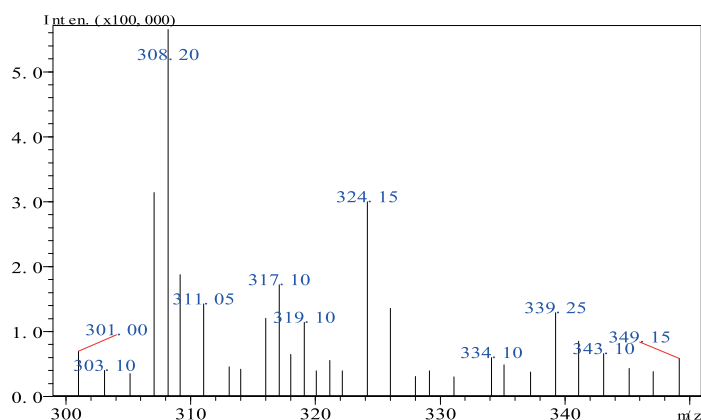


图1 Neu5Ac和Neu5Gc一级质谱图

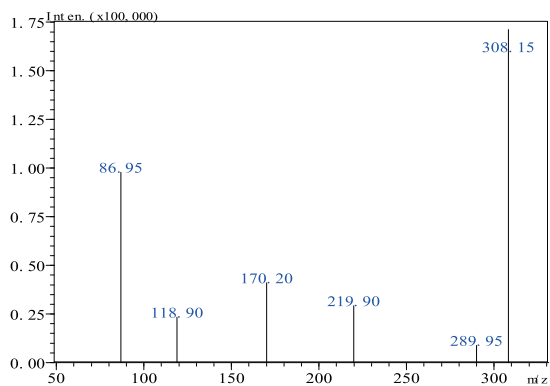


图2 Neu5Ac二级质谱图

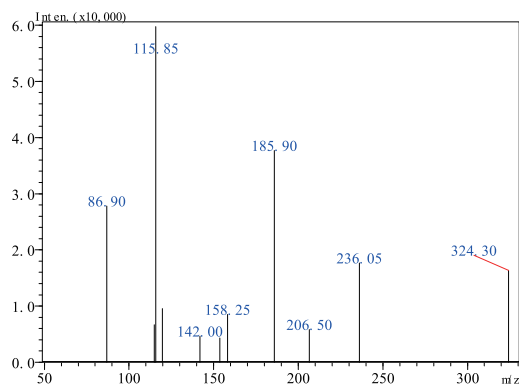


图3 Neu5Gc二级质谱图

2.2 选择性

取空白溶剂适量，按照 1.6 方法处理并测定，见图 4~7。结果表明，空白溶剂及内标化合物对唾液酸的定量检测无明显影响。

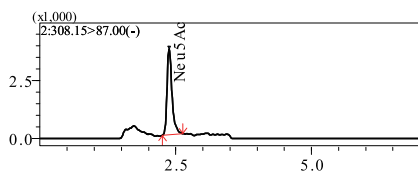


图4 标准品及内标MRM色谱图
(0.02 μmol/L Neu5Ac)

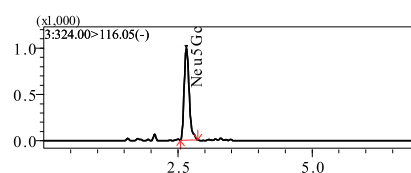


图5 标准品及内标MRM色谱图
(0.008 μmol/L Neu5Gc)

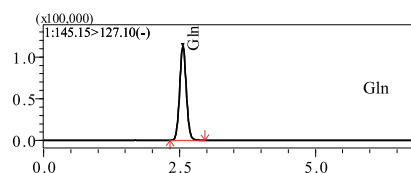
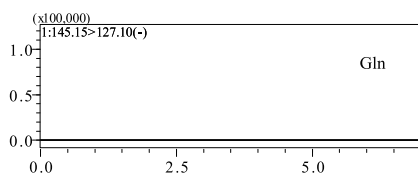
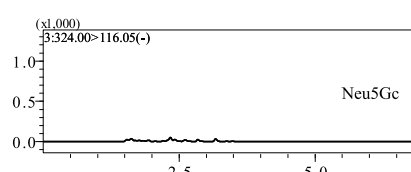
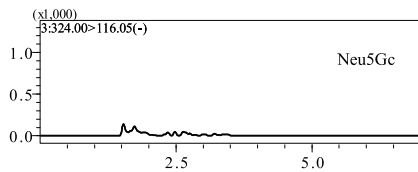
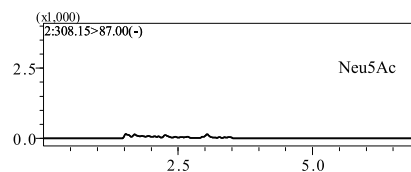
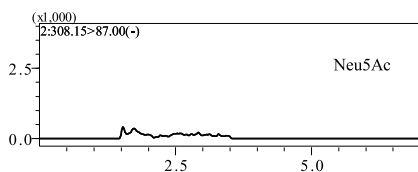
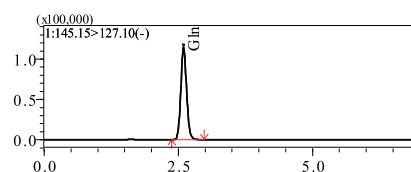
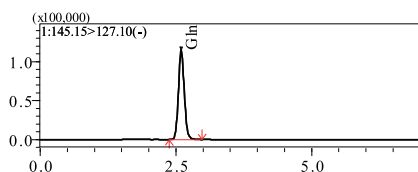


图6 空白溶剂MRM色谱图

图7 内标MRM色谱图

2.3 线性关系

将 1.5 配制的 7 个标准曲线点溶液，按 1.3 中的分析条件进行测定，以浓度比为横坐标，峰面积比为纵坐标，内标法制作校准曲线，线性良好。线性方程、相关系数、线性范围及准确度范围见表 4 和图 8~9。

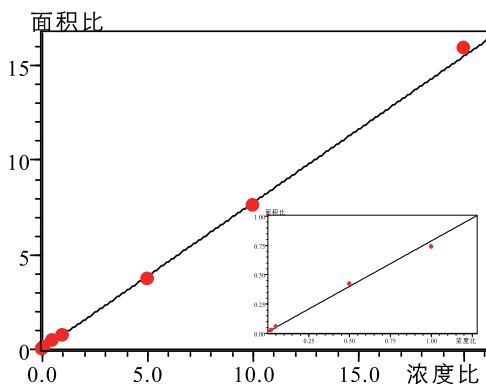


图8 Neu5Ac工作曲线

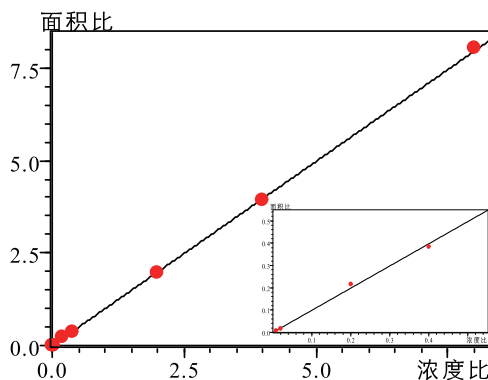


图9 Neu5Gc工作曲线

表4 线性结果

化合物	回归方程	r	线性范围 (μmol/L)	准确度范围 (%)
Neu5Ac	$Y = (0.775159)X + (0.0131729)$	0.9995	0.02~20	93.4~111.6
Neu5Gc	$Y = (0.994556)X + (-0.000714067)$	0.9998	0.008 ~8	96.7~102.8

2.4 重复性与准确度

配制含不同浓度 Neu5Ac 和 Neu5Gc 的混合标准溶液，Neu5Ac 和 Neu5Gc 浓度分别为 0.06 μmol/L 和 0.024 μmol/L、1 μmol/L 和 0.4 μmol/L、6.4 μmol/L 和 16 μmol/L，按照步骤 1.6 进行处理，平行测定 6 次，考察重复性和准确度，结果如表 5~6 所示，低中高三种不同浓度的质控品平行测定 6 次，Neu5Ac 和 Neu5Gc 测定结果的 RSD 分别为 1.45%~2.91% 和 0.78%~5.35%，结果均值的准确度分别为 86.5%~94.9% 和 91.7%~101.8%，说明该方法的重复性和准确度良好。

表5 Neu5Ac重复性和准确度结果(n=6)

理论浓度 (μmol/L)	重复性 RSD (%)	实测浓度 (μmol/L)	准确度 (%)
0.06	2.91	0.052	86.5
1	1.85	0.881	88.1
16	1.45	15.178	94.9

表6 Neu5Gc重复性和准确度结果(n=6)

理论浓度 (μmol/L)	重复性 RSD (%)	实测浓度 (μmol/L)	准确度 (%)
0.024	5.35	0.022	90.7
0.4	1.06	0.366	91.4
6.4	0.78	6.512	101.8

2.5 残留

在高浓度样品 (STD7) 后进样分析空白样品, 考察 Neu5Gc 和 Neu5Ac 的残留情况。结果如图 10~11, 结果表明在本分析系统下, Neu5Ac 和 Neu5Gc 均无明显残留。

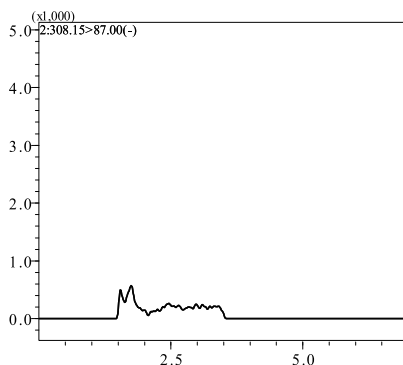


图8 Neu5Ac残留MRM色谱图

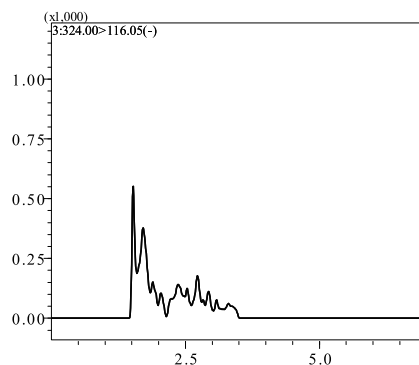


图9 Neu5Gc残留MRM色谱图

2.6 样品测定

取酸解好的样品溶液 5 μ L, 按 1.3 中的分析条件进行测定, 按内标法计算, 测定结果如表 7 所示。

表7 样品测定结果

化合物	单抗样品 (μ mol/L)
Neu5Ac	11.2
Neu5Gc	0.328

结论

使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 和三重四极杆质谱仪 LCMS-8060 联用测定了抗体中的唾液酸 N- 乙酰神经氨酸 (Neu5Ac) 和 N- 羟乙酰神经氨酸 (Neu5Gc)。样品经简单前处理后, 以酰胺基色谱柱进行分离, 采用 LCMS-8060 在 7 min 内完成了内标法定量分析。本文对方法的专属性、线性、精密度与准确度及残留进行了考察。结果显示该方法专属性良好, Neu5Ac 和 Neu5Gc 的线性相关系数均大于 0.999, 低中高三个浓度质控品的重复性 RSD 在 0.78%~5.35% 之间, 准确度范围为 86.5%~101.8%, Neu5Ac 和 Neu5Gc 在本系统下均无明显残留, 不影响样品中唾液酸的定量测定。

此方法前处理简单、分析快速、选择性强、重复性好和灵敏度高的特点, 可为抗体唾液酸化的监测提供借鉴和参考。